



Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem
Villamosmérnöki és Informatikai Kar

A szomatikus mikroglia-idegsejt kapcsolat ultrastruktúrája és patológiás szerepe

Tudományos Diákköri Dolgozat

Ujvári Katinka

TRBFZ4

Egészségügyi mérnök mesterképzés

Külső konzulens:

Dr. Pósfai Balázs

tudományos segédmunkatárs

Kísérleti Orvostudományi
Kutatóintézet

Neuroimmunológia Kutatócsoport

Belső konzulens:

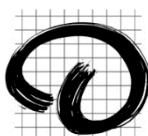
Dr. Bonyár Attila

egyetemi docens

Budapesti Műszaki és
Gazdaságtudományi Egyetem

Villamosmérnöki és Informatikai Kar

Elektronikai Technológia Tanszék



Institute of Experimental Medicine
Hungarian Academy of Sciences



Tartalomjegyzék

1. Jelölésjegyzék	4
2. Bevezetés	5
3. Szakirodalmi áttekintés	6
3.1. A mikroglia sejtek	6
3.2. A közvetlen szomatikus mikroglia-idegsejt kapcsolat	8
3.2.1. P2Y ₁₂ receptor	9
3.2.2. Kv2.1 fehérje	10
3.2.3. Mitokondrium	10
3.2.4. Purinerg vezikulák	11
3.3. A kapcsolat további lehetséges molekuláris résztvevői	11
3.3.1. C1q fehérje	11
3.3.2. Connexin fehérjék	13
3.4. Iszkémiás stroke	14
4. Célkitűzés	16
5. Módszerek	17
5.1. Etikai állásfoglalás	17
5.2. Állatok	17
5.3. Post mortem humán minták	17
5.4. In vivo beavatkozások és mérések	18
5.4.1. PSB beadás a cisterna magna-ba	18
5.4.2. Kísérletesen előidézett iszkémiás stroke	18
5.5. Minták előkészítése	19
5.6. TTC festés	19
5.7. Immunfluoreszcens hisztokémia	19

5.8. Konfokális mikroszkópia.....	20
5.8.1. Képkötés konfokális lézer-pásztázó mikroszkóppal	20
5.8.2. Idegsejtek mikroglialis borítottságának mérése	20
5.8.3. Stroke-os szöveten végzett anatómiai vizsgálatok	20
5.8.4. Mitokondriális fragmentáció mérése.....	20
5.8.5. Kv2.1 klaszterek mérése.....	21
5.8.6. C1q és connexin fehérjék mérése	21
5.9. Statisztika.....	21
6. Eredmények	22
6.1. A penumbra régióban megnövekszik az idegsejtek mikroglialis borítottsága iszkémiás stroke-ot követően	22
6.2. Iszkémiás stroke következtében a Kv2.1 klaszterek feloszlanak az idegsejt membránjában	23
6.3. A neuronális mitokondriumok fragmentációja figyelhető meg oxigénhiányos körülmények között	24
6.4. A C1q fehérjét tartalmazó szomatikus kapcsolatok aránya jelentősen megnövekszik a penumbrában	25
6.5. Stroke-ot követően a connexin fehérjék nagyobb számban találhatók meg a mikroglia-idegsejt kapcsolatokban.....	26
7. Diskusszió	28
8. Irodalomjegyzék.....	31
9. Függelék.....	36
9.1. Az alkalmazott elsődleges antitestek listája	36
9.2. Az alkalmazott másodlagos antitestek listája	36
9.3. Nyilatkozat a hallgatói munkáról.....	37

1. Jelölésjegyzék

ATP	adenozin-trifoszfát
cAMP	ciklikus adenzin-monofoszfát
C1q	komplement komponens 1q
C57Bl/6J	transzgenikus egértörzs
cFos	proto-onkogén fehérje, azonnali korai gén
CR3	komplement receptor 3
CSF1R	kolóniastimuláló faktor 1 receptor
CX	connexin
CX43	connexin-43
CX46	connexin-46
DAPI	2,4-diamidino-2-fenilindol
G_q	foszfolipáz C stimulálásához vezető G-fehérje
HSA	humán szérum albumin
Fc-fragments	immunglobulinok „fragment crystallizable” része
Kv2.1	feszültségfüggő kálium-csatorna fehérje
P2Y12R	P2Y12 receptor
PB	foszfát puffer
PSB	PSB0739 (szelektív P2Y12R antagonist)
snRNS	kis nukleáris ribonukleinsav
TBS	trisz-(hidrometil)-amino-metán
TOM20	mitokondriális külső membrán transzlokáz komplex
TTC	2,3,5-trifeniltetrazolium-klorid
VNUT	vezikuláris nukleotid transzporter

2. Bevezetés

Napjainkban emberek milliói szenvednek idegrendszeri megbetegedésekben. A legtöbb kórkép esetében azonban jelenleg nem áll rendelkezésre megfelelő terápiás kezelés, mivel a betegségekkel kapcsolatos ismereteink hiányosak, kialakulásuk pontos okai csupán részben ismertek, és a kialakulásukban szerepet játszó celluláris és molekuláris mechanizmusok zöme máig tisztázatlan.

Az elmúlt évtizedekben az idegrendszer fiziológias és patológias folyamatainak megértése érdekében folytatott vizsgálatok egyértelműen idegsejt-központúak voltak, elsődlegesen az idegsejtek funkcióját és anatómiáját vizsgálták. Az idegrendszeri betegségek terápiáját célzó, neuroprotektív eljárások hatékonyságát felmérő klinikai vizsgálatok zöme ugyanakkor nem vezetett eredményre, ami felveti egy gyökeresen új szemléletmód szükségességét (Anderson et al., 2017).

A szervezet saját immunrendszerének támogatása és hadrendbe állítása más, nem idegrendszeri kórképekben is felmerült, így például a rákos sejtek ellen jelentős áttörést hozott a daganatterápiában, aminek felfedezéséért a 2018-as orvosi-élettani Nobel-díjat egy amerikai és egy japán kutatónak ítelték oda. Érdemes lehet ezt a lehetőséget az agy esetében is megvizsgálni, ehhez viszont jobban meg kell ismernünk annak fő immunsejtjét, a mikroglit.

A központi idegrendszerben az idegsejtek mellett ugyanis számos gliasejt is található és megfelelő működésük alapvetően meghatározza az idegsejtek állapotát, valamint a sérült idegsejtek túlélését. A mikroglia sejtek szerepe a központi idegrendszert érő káros hatások elleni védelemben, és az elpusztult idegsejtek eltávolításában régóta ismert és széles körben kutatott. Ezen túlmenően a mikroglia az agyi gyulladással kapcsolatos folyamatok központi irányítója is (Li & Barres, 2018). Az elmúlt években folytatott kutatások kimutatták a gyulladással kapcsolatos folyamatok szerepét olyan – klasszikus értelemben nem gyulladással – idegrendszeri megbetegedéssel járó kórfolyamatokban is, mint a migrén, a stroke, az autizmus, az epilepszia, az Alzheimer-kór, a skizofrénia és a Parkinson-kór (Chen et al., 2016; Degan et al., 2018; Ransohoff, 2016). Részben ezen felismerések hatására is, a közelmúltban a mikroglia patológias állapotokban betöltött szerepe intenzív vizsgálatok tárgyát képezte (Salter & Stevens, 2017), azonban fiziológias körülmények között mutatott viselkedésének és lehetséges funkciójának tanulmányozása ezidáig háttérbe szorult, holott ezek megismerésén keresztül az idegrendszeri betegségekben játszott szerepe is könnyebben érthetővé válna.

3. Szakirodalmi áttekintés

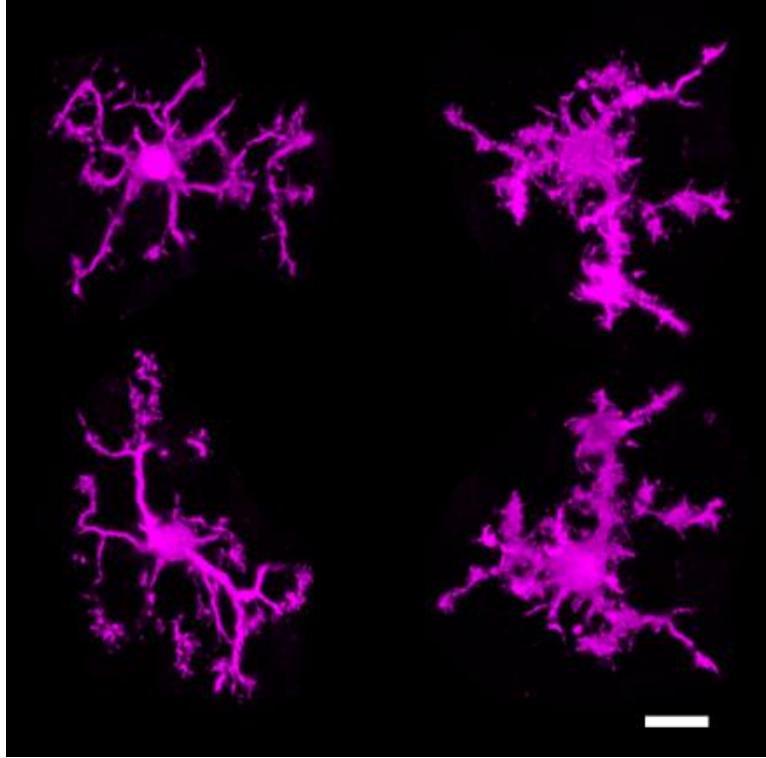
3.1. A mikroglia sejtek

A mikroglia kifejezés Pío Del Río-Hortega nevéhez köthető, aki közel száz évvel ezelőtt figyelt fel egy, a központi idegrendszerben megfigyelt, sajátos morfológiával rendelkező sejt típusra (Pío del Río-Hortega, 1939). Mára már jól ismert, hogy a mikroglia sejtek a központi idegrendszer 10-15%-át kitevő szöveti makrofág sejtek, amik nagyrészt homogén eloszlást mutatnak az idegszövetben (Li & Barres, 2018).

A mikroglialis prekursorok a középső csíralemezből származnak, és az embrionális fejlődés első trimeszterében, az agy sejtjes elemei közül elsőként jutnak be a fejlődő idegrendszerbe, ahol a mikroglia az agy „rezidens makrofágjaként” kiemelten fontos szerepet tölt be az egészséges idegrendszer fejlődésében (Bilimoria & Stevens, 2015; Ginhoux et al., 2010).

A külső csíralemez eredetű makroglia sejtekkel ellentétben, amik csak az idegsejtek megjelenését követően népesítik be a központi idegrendszert, a mikroglia sejtek progenitorai már az emberi terhesség 5. hetében megjelennek az idegső körül, míg rágcsálókban már a megtermékenyítés utáni 8. napon jelen vannak a későbbi agy területén (Ginhoux et al., 2010; Verney et al., 2010). Ezt követően érintő- és sugár irányban vándorolnak a fejlődő idegszövetben, majd intenzív proliferáció során a posztnatális periódus korai szakaszában elérik a véglegeshez közeli sejtszámukat (Monier et al., 2007). A fejlődés alatt többek között részt vesznek a neuro-, a glió-, illetve az angiogenezis szabályozásában (Erblich et al., 2011; Mosser et al., 2017; Ueno et al., 2013), a neuronális prekursorok differenciációjában és migrációjában (Aarum et al., 2003), az axonok növekedésében és irányításában (Dalmau et al., 1998; Pont-Lezica et al., 2014; Squarzoni et al., 2014), a szinapszisok létrehozásában és aktivitás-függő eltávolításában (Lim et al., 2013; Miyamoto et al., 2016; Schafer et al., 2012), a szinapszisok és dendrittüskék átalakításában (Parkhurst et al., 2014), valamint az agykérgi sejtrétegek kialakításában (Cunningham et al., 2013).

A múlt század folyamán, pusztán fixált szöveten végzett fénymikroszkópos megfigyelésekre alapozva a mikroglia sejtek két, morfológiailag jól differenciálható alakját különböztették meg egymástól: a „nyugvó” (resting) valamint az „aktivált” (activated) állapotot (1. Ábra).



1. Ábra Immunhisztokémiai jelölést követően a mikroglia sejtek kétféle alakja („nyugvó” – bal oldali sejtek; „aktivált” – jobb oldali sejtek) jól megkülönböztethető a konfokális fluoreszcens mikroszkóp segítségével készített saját felvételünkön. Méretvonal: 10 μm

A „nyugvó” mikroglia sejteket kisméretű sejttest, illetve sok elágazó, vékony nyúlvány jellemzi. Ezek a sejtek környezeti ingerek hatására képesek átalakulni az „aktivált” formába, amelyek megnövekedett sejttesttel, kevesebb és megrövidült nyúlványokkal rendelkeznek, valamint megnövekedett fagocitotikus aktivitást mutatnak (Kierdorf & Prinz, 2017; Mosser et al., 2017). Ma már bebizonyosodott, hogy a „nyugvó” sejtek nyúlványai folyamatos, dinamikus mozgást végeznek az idegszövetben, így a korábban alkalmazott „nyugvó” elnevezés használata hibás és félrevezető lehet (Nimmerjahn et al., 2005). A nyúlványok mozgása lehetőséget teremt a mikroglia sejtek számára, hogy a környezetükben lévő más sejtekkel kapcsolatokat létesítsenek, és módosítsák azok működését – így például a mikroglia sejtek mind a fejlődés során, mind felnőttkorban fontos szerepet játszanak a szinaptikus jelátvitel szabályozásában, mivel képesek többek között új szinapszisok kialakulásának indukálására, valamint már meglévő szinapszisok eliminálására és a szinaptikus plaszticitás szabályozására is (Pósfai et al., 2018).

A mikroglia sejtek részvétele az agyi gyulladási folyamatokban régóta ismert, hiszen számos gyulladási mediátor és citokin felszabadulása figyelhető meg ezekből a sejtekből gyulladási körülmények között (Carniglia et al., 2017). Az agyi gyulladási folyamatok

vizsgálata az utóbbi évtizedben került különösen reflektorfénybe, mivel kiderült, hogy olyan betegségek kialakulásában játszanak szerepet, mint a migrén, a stroke, az autizmus, az epilepszia, az Alzheimer-kór, a skizofrénia és a Parkinson-kór (Chen et al., 2016; Degan et al., 2018; Ransohoff, 2016). Mindeközben a megfelelő eszközök hiányában a mikroglia sejtek pontos szerepe ezekben a betegségekben vitatott maradt, mivel szelektív vizsgálatokra a sejtspecifikus markerek és fehérjék ismeretének hiányában nem nyílt lehetőség. Egészen a közelmúltig az is vita tárgyát képezte, hogy vajon a mikroglia sejtek az idegsejtek számára protektív, vagy káros hatással bírnak.

Ennek a kérdésnek a megválaszolásában fontos mérföldkőnek számított az a tanulmány, amelyet a Dénes Ádám irányította Neuroimmunológia Kutatócsoport jegyzett 2016-ban. Ebben egy új, szelektív hatásmechanizmusú (CSF1R inhibitor) drog, az ún. PLX3397 segítségével eltávolították a mikroglia sejteket felnőtt egerek agyából, majd ennek hatását vizsgálták kísérletesen előidézett iszkémiás stroke kimenetelére. A mikroglia sejtek hiányában az idegsejtek sokkal nagyobb területen haltak el, mint a droggal nem kezelt egerekben, valamint a neuronális hálózati aktivitás is súlyos zavart szenvedett (Szalay et al., 2016).

Mindez megvilágítja a mikroglia sejtek neuroprotektív szerepét, valamint feltételezi egy, a szinaptikus terminálisokon és dendrittüskéken túli, eddig ismeretlen kommunikációs útvonal jelenlétét a mikroglia sejtek és a neuronok között, amely közvetlenül alkalmas lehet az idegsejtek általános működésének monitorozására, esetleges módosítására. Egy ilyen kapcsolat a szakirodalomban ezidáig ismeretlen volt.

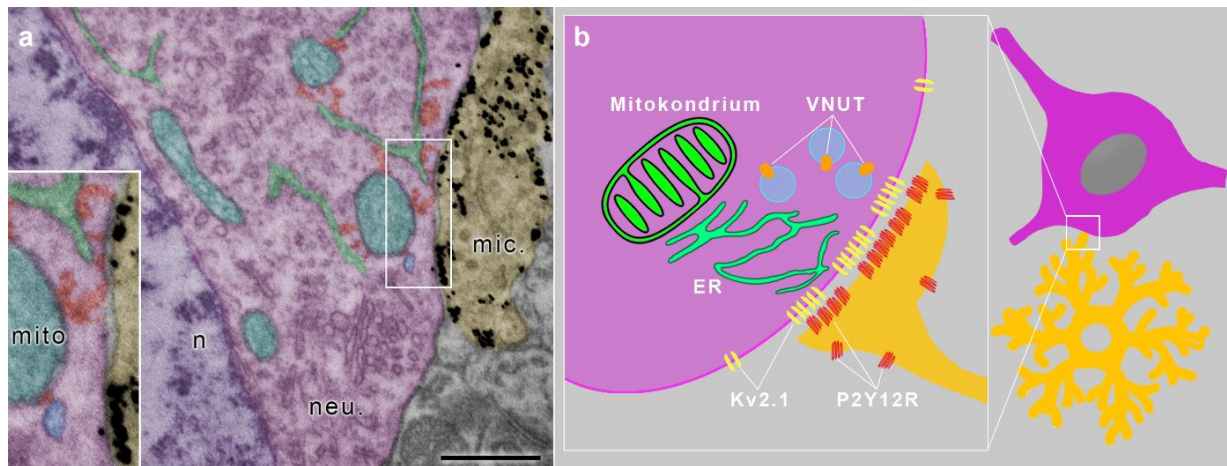
3.2. A közvetlen szomatikus mikroglia-idegsejt kapcsolat

A fentebb tárgyalt hipotézisnek megfelelően kutatócsoportunknak a Science folyóiratban közölt eredményei során valóban sikerült megfigyelnie, hogy a korábban ismert szinaptikus kapcsolatokon túl a mikroglia sejtek közvetlenül hozzáérnek az idegsejtek sejttestjéhez is. Ennek a felfedezésnek köszönhetően sikeresen azonosítottunk egy újfajta, korábban nem dokumentált kapcsolatot, ami az idegsejtek sejttestje és a mikroglia sejtek dinamikusan mozgó nyúlványai között jön létre (Cserép et al., 2019).

Konfokális fluoreszcens mikroszkópos felvételeink segítségével meghatároztuk, hogy ez a kapcsolat rendkívül gyakori és általános jelenség a hippokampusz és a neokortex területén, mivel piramissejtek és különböző gátló interneuron populációk esetében egyaránt igen nagy számban található meg. Sejtípustól függetlenül adott pillanatban az egér idegsejtek mintegy 90%-a részesül mikroglialis bemenetben.

Annak megerősítése érdekében, hogy valóban közvetlen membránkapcsolat alakul ki a kétféle sejttípus között, nagyobb felbontást biztosító elektronmikroszkóppal vizsgáltuk a kapcsolatot és azt láttuk, hogy egér, illetve humán agyszövetben egyaránt közvetlen membránkapcsolat alakul ki a mikroglia sejtek nyúlványa és az idegsejtek sejttestje között.

További kísérleteink során a közvetlen szomatikus mikroglia-idegsejt kapcsolat számos molekuláris résztvevőjét sikerült azonosítanunk (*Hiba! A hivatkozási forrás nem található.*):



2. Ábra (a) Transzmissziós elektronmikroszkópos felvétel egy P2Y12R+ (immunarany szemcsék) mikroglia nyúlvány (mic) és egy idegsejt (neu) sejttestjének kapcsolatáról (n-sejtmag). A kapcsolat közvetlen közelében megfigyelhető egy mitokondrium (mito), valamint a sejtmembránhoz lehorgonyozott retikuláris sejtorganellek. **(b)** Összefoglaló sematikus ábra, amelyen az újonnan leírt kapcsolat azonosított szereplőit látni. Méretvonal: 500 nm (Cserép et al., 2019)

3.2.1. P2Y12 receptor

A P2Y12 receptor (P2Y12R) az adozin-foszfátokra érzékeny receptorcsalád tagja, ami a központi idegrendszerben kizárólag a mikroglia sejtek membránjában fordul elő. (Butovsky et al., 2014; Kettenmann et al., 2011). A mikroglialis nyúlványok a P2Y12 receptor segítségével képesek a károsodást szenvedett idegszövet helyére toborzódni (Haynes et al., 2006), ennek a gyors kemotaktikus válaszreakciónak a központi mediátora pedig a sejtekből felszabaduló ATP (Davalos et al., 2005). A P2Y12 receptor tehát aktív résztvevője az idegszövetet ért környezeti változásokra adott dinamikus mikroglialis reakcióknak.

Transzmissziós elektronmikroszkóppal készített felvételeink során a mikroglia sejtek nyúlványait az agyban kizárólag a mikroglialis membránban megtalálható P2Y12 receptorok megjelölésével azonosítottuk. A fentebb tárgyalt felfedezésen túl azt is megfigyeltük, hogy a

receptorok megoszlása nem egyenletes a mikroglialis membránban: a P2Y₁₂ receptorok jelentősen nagyobb számban fordulnak elő a mikroglia sejtek azon membránrégióiban, amelyek részt vesznek a szomatikus mikroglia-idegsejt kapcsolatban.

3.2.2. Kv2.1 fehérje

Irodalmi adatok alapján ismert, hogy a Kv2.1 fehérjék kétféle formában fordulhatnak elő a piramissejtek membránjában. Alapvetően a piramissejtek szomatodendritikus membránjában egyesével elszórtan feszültségfüggő kálium-csatornaként funkcionálnak. Azonban csoportosult, ún. klaszterek formájában már nem ionszatornaként működnek, hanem az intenzív endo- és exocitózis színhelyét jelölik (Deutsch et al., 2012), továbbá részt vesznek az endoplazmás retikulum sejtmembránhoz történő kihorgonyzásában is (Fox et al., 2015). Ez a klaszter-képződés a piramissejtek endogén, környezettől független tulajdonsága.

Megfigyeltük, hogy a mikroglia nyúlványok ezen utóbbi területeken, vagyis a Kv2.1-klaszterekkel jellemezhető membránszakaszokon érintik meg az idegsejtek sejttestjét. A neuronok által itt kibocsátott és felvett anyagok információt szolgáltathatnak a sejt általános állapotáról, amelyekből a mikroglia teljes képet kaphat az idegsejt működéséről.

3.2.3. Mitokondrium

A mitokondriális működés kiemelkedően jó indikátora a neuronális sejtaktivitásnak, ugyanis meglehetősen gyorsan és érzékenyen reagálnak az idegsejt környezetének változásaira. A mitokondrium elsősorban a sejt anyagcserefolyamataihoz szükséges energiatermelésért felelős organelum. A tápanyagok oxidációjából keletkezett energia foszfátkötésekben tárolódik és ATP szintézisére fordítódik. A mitokondrium emellett fontos szerepet játszik többek között a sejthalál beindításában is (Wang & Youle, 2009). Ezek alapján látható, hogy a mitokondrium által termelt fehérjék és egyéb molekulák jó képet adhatnak a sejt aktivitásáról és általános állapotáról (Llorente-Folch et al., 2015).

Megvizsgáltuk a mitokondriumok elhelyezkedését az újonnan leírt mikroglia-neuron szomatikus kontaktus tekintetében és azt tapasztaltuk, hogy a neuronális oldalon található mitokondriumok ötször nagyobb valószínűséggel fordulnak elő a mikroglialis kontaktusok területén, mint a sejt egyéb régióiban. Vagyis a mitokondrium fontos szerepet játszhat a mikroglia sejtek és az idegsejtek itt zajló kommunikációjában, ugyanis a mikroglia nyúlványok az idegsejtek azon részein igyekeznek kapcsolatot kialakítani, ahol a közelben mitokondrium található.

3.2.4. Purinerg vezikulák

Korábbi kísérleteink során megfigyeltük, hogy a szomatikus kontaktusban részt vevő mikroglia sejtek oldalán számos purinerg metabotróp receptor található. Ezen P2Y₁₂ receptorok szubsztrátja többek között az idegsejtekből felszabaduló ATP. Ismert, hogy a mitokondriumokban termelődött ATP aspecifikus csatornákon keresztül is kiürülhet a sejtekből, azonban a neuronális sejttestben található VNUT (vezikuláris nukleotid transzporter) fehérje segítségével vezikulákban tárolódva is készen állhat a felszabadulásra (Moriyama et al., 2017). Kísérleteink során azt tapasztaltuk, hogy ezen vezikulák számos esetben a mikroglialis kapcsolatok közelében találhatók meg, ami felveti az ATP szerepét a mikroglia-neuron kommunikációban.

Fiziológiás körülmények között akkor szabadul fel ATP az idegsejtekből, amikor növekszik a sejtek aktivitása. Ezzel párhuzamosan azt tapasztaltuk, hogy fiziológiás sejtaktivitás növekedés hatására a nagy aktivitást mutató idegsejtek esetében a mikroglia által érintett neuronális sejt felszín aránya jelentősen megnövekedett, ami P2Y₁₂ receptor függő módon ment végbe. Ezek alapján feltételezhető, hogy a mikroglialis válasz aktivitásfüggő, és kialakításában esszenciális szerep jut a P2Y₁₂ receptorok számára (Cserép et al., 2019)

3.3. A kapcsolat további lehetséges molekuláris résztvevői

Az előzőekben részletezett szomatikus mikroglia-idegsejt kapcsolatnak kiemelkedő szerepe lehet mind az idegsejtek fiziológiás működésének fenntartásában, mind pedig az idegrendszeri betegségek patofiziológiájában (Cserép et al., 2020). Annak érdekében, hogy jobban megérthessük ezt az összetett rendszert, minél pontosabban meg kell ismernünk a kapcsolatban részt vevő molekulákat. Munkám során irodalmi adatokra támaszkodva az alábbi fehérjék potenciális jelenlétét vizsgáltam a szomatikus mikroglia-idegsejt kapcsolatban fiziológiás körülmények között, illetve kísérletesen előidézett iszkémiás stroke-ot követően:

3.3.1. C1q fehérje

A C1q fehérje a kalcium-függő C1 immunkomplexet felépítő három molekula egyike, ami a szisztémás immunrendszer védekező folyamatai közben más immunkomplexek felismerése révén fontos szerepet játszik a komplement rendszer klasszikus útjának aktiválásában (Reid, 2018). A C1q fehérje ugyanis ligandként a fagocitózisra szánt sejtek felszínén található apoptotikus markerekhez kötődik, majd ezt a C1q fehérjét képesek felismerni más immunkomplexek aktivált receptor alegységei. A kialakult komplement

receptor-C1q komplex pedig ún. opsonizációs jelként szolgál makrofág sejtek számára, ezáltal kiváltja a komplement rendszer jelátviteli útvonalainak elindítását (Gullstrand et al., 2009; Mevorach et al., 1998; Nauta et al., 2002). Így tehát a C1q fehérje az immunrendszer részeként közvetett módon lát el neuroprotektív feladatot a központi idegrendszerben és felveszi a harcot a fertőző ágensekkel szemben (Cho, 2019).

A C1q a mikroglia-idegsejt kommunikációban is bizonyítottan szerepet játszik, ugyanis az idegrendszer fejlődése során az ezzel a fehérjével megjelölt szinapszisokat - akár azért, mert hibásan működnek, akár azért, mert a fejlődés során feleslegessé válnak - a mikroglia sejtek fagocitotikus úton eltávolítják (Schafer et al., 2012; Stevens et al., 2007). Amennyiben hiba lép fel a szinapszisok eltávolítása során, az súlyos neurodegeneratív betegségek kialakulásához vezethet (Chang et al., 2017). Megfigyelték például, hogy a C1q szinapszisokat szabályozó mechanizmusában fellépő zavar hozzájárul az epilepszia kialakulásához: a kísérlet során olyan egereket vizsgáltak, amikben születésüktől fogva hiányzott a C1q fehérjét kódoló génszekvencia: a felesleges szinapszisok eltávolításának hiánya meghosszabbodott dendriteket, megnövekedett számú elágazásokat és megnövekedett sűrűségű dendrittüskéket eredményezett. Ezen állatok esetében spontán epileptiform aktivitást figyeltek meg a kutatók (Cho, 2019; Ma et al., 2013).

Egy 2021-es tanulmány azonban arra a következtetésre jutott, hogy a mikroglia nagy valószínűséggel nem kizárólag a fagocitózisra szánt neuronális elemek megjelölésére használja a C1q fehérjét. A kutatás során a fejlődő idegrendszerben bekövetkező változásokat tanulmányozták a mikroglia sejtek fő komplement receptorának, a CR3-nak a hiányában. A CR3 receptor nélkül a mikroglia - jelenlegi ismereteink szerint - nem képes érzékelni a C1q fehérjét. Azonban a korábbi feltételezésekkel ellentétben a kísérlet során nem tapasztaltak zavart a szinapszisok-, valamint az axonok eliminációjának folyamatában a fejlődő egér agykéregben (Basilico et al., 2021).

Ezzel párhuzamosan Holden és munkatársai enyhe traumás idegrendszeri károsodást követően vizsgálták a C1q szerepét. Megfigyelték, hogy a C1q fehérje jelentős mértékben felhalmozódik a másodlagos sérülés kialakulásának területén, és snRNS szekvenálás segítségével bebizonyosodott, hogy mikroglialis eredetű C1q-ra vezethető vissza. A mikroglia sejtek a C1q molekula segítségével képesek megjelölni a károsodott agykérgi idegszövetet és a hozzá funkcionálisan kapcsolódó talamusz területét. A C1q-jelölés korai diagnosztizálásával és sikeres intervencióval jó eséllyel megelőzhető a másodlagos neurodegeneratív folyamatok kialakulása (Holden et al., 2021).

Mivel a mikroglia-idegsejt kommunikáció C1q-n keresztül bizonyítottan létrejöhet, illetve a fentebb tárgyalt eredmények alapján feltételezhető, hogy a C1q fehérje további fontos szerepet is betölthet a sejtek közti kommunikáció során, ezért vizsgálni kívántuk annak a lehetőségét, hogy ez a fehérje a szomatikus mikroglia-idegsejt kontaktusban is megtalálható-e fiziológiás, illetve patológiás körülmények között. A C1q és a mikroglia sejtek közötti kommunikáció kulcsszerepet játszik számos neurodegeneratív betegség mellett az öregedés folyamatában is, ezért kettejük kapcsolatának jobb megértése kiemelten fontos idegrendszerünk védelme érdekében (Chu et al., 2010).

3.3.2. Connexin fehérjék

Az ún. gap junction vagy másnéven réskapcsolat egy speciális sejt-sejt kapcsolat, ami szomszédos sejtek citoplazmái között létrejövő, körülbelül 1,5-2 nm átmérőjű, folyadékkal telt csatorna. Ezek a réskapcsolatok lehetőséget biztosítanak kis méretű molekulák (intracelluláris mediátorok, ATP, cAMP, ionok), illetve terápiás ágensek transzportjára (András Szarka, 2014). A réskapcsolatok kialakításában különböző fehérjék játszhatnak szerepet, mint például a connexinek (CX). A CX molekulák közé négy transzmembrán doménnel rendelkező integráns membránfehérjék tartoznak (Delvaeye et al., 2018), mint például a Connexin 43 (CX43) és a Connexin 46 (CX46) molekulák. A connexin fehérjéknek emberben 21, míg egérben 20 izotípusuk létezik, amiből 11 az agyban található meg (Rouach et al., 2002; Söhl et al., 2002; Söhl & Willecke, 2003, 2004). Réskapcsolatok azokon a területeken alakulhatnak ki, ahol két szomszédos sejt membránjában megtalálhatóak egymással kapcsolódni képes connexinek. Azonban egyes connexinek önmagukban is képesek a membránban csatornaként - ún. hemichannelként - funkcionálni, és lehetővé tenni kisméretű mediátorok kiürülését az idegsejtekből (Decrock et al., 2015).

A CX molekulacsalád egyik legszélesebb körben kutatott tagja a fentebb említett Connexin 43 (CX43), ami a központi idegrendszerben elsősorban az asztrociták felszínén fordul elő, de megtalálható a fejlődő idegsejtek, az aktivált mikroglia sejtek, a periciták, valamint az agyi erek endotél sejtjeinek membránjában is (Chew et al., 2010; Nagy & Rash, 2000; Naus et al., 1991). Számos kísérlet bizonyította, hogy a mikroglia sejtek a CX43 fehérjén keresztül képesek réskapcsolatokat kialakítani egymás között és az idegrendszert ért gyulladásoz folyamatok során ezeken a csatornákon keresztül intenzív kommunikációt folytatnak egymással (Eugenín et al., 2001).

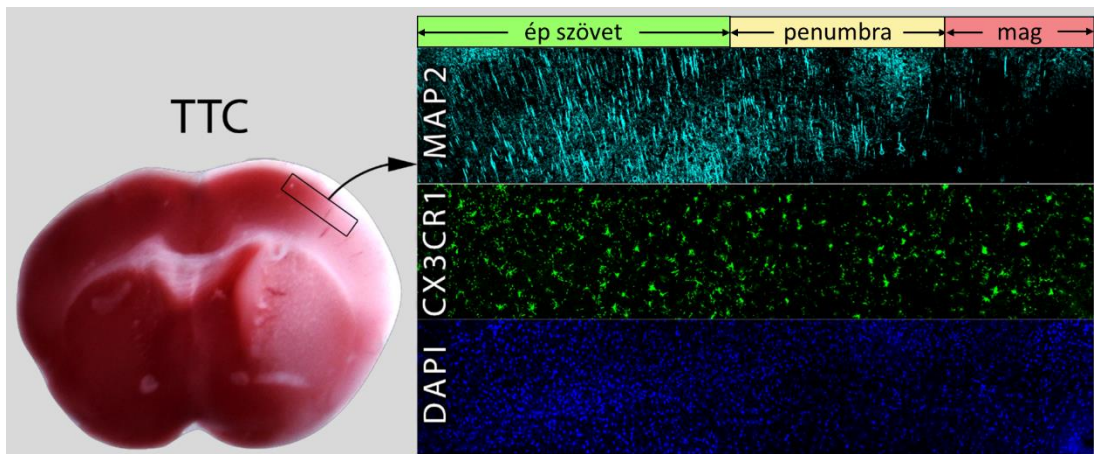
A mikroglia sejtek bizonyítottan P2Y₁₂ receptor függő módon képesek reagálni az idegsejtek megnövekedett aktivitására, a purinerg metabotróp P2Y₁₂ receptorok egyik legjelentősebb szubsztrátja pedig az ATP. Ez az ATP képes olyan nem specifikus csatornákon is távozni az idegsejtekből, mint például a connexin fehérjék. Mivel az ATP sejtekből való felszabadulása jó jelzésként szolgálhat az idegsejt aktuális állapotáról a mikroglia sejtek számára, ezért érdemes lehet megvizsgálnunk a connexin molekulák szomatikus mikroglia-idegsejt kapcsolatokban való előfordulását.

3.4. Iszkémiás stroke

A stroke napjaink egyik legnagyobb globális egészségügyi problémája, ami évente több mint 17 millió embert érint világszerte. Kialakulása elsősorban az idősebb korosztályt veszélyezteti, de bármely más életkorban is megjelenhet a betegség. Az esetek 30-35%-a halálos kimenetelű, és az érelzáródást követő napokat túlélő betegek 10-15%-a is egy éven belül életét veszti a szekunder sérülés kiterjedtsége és a következmények miatt, illetve jelentős hányaduk maradandó idegrendszeri károsodással küzd (Hankey, 2017; Iadecola, 2011).

A stroke-os esetek döntő többsége két nagy csoportba sorolható. Az egyik a hemorrágiás vagy vérzéses stroke, amit egy agyi érfal megrepedése okoz, míg a másik típus a kóresetek mintegy 87%-át kitevő ún. iszkémiás stroke, amely egy agyi artéria elzáródása következtében alakul ki (Amarenco et al., 2013). Mindkét folyamat során lokális oxigénhiányos állapot lép fel az érintett artéria ellátási területén, ami gyors és súlyos szöveti elhalást okozhat az agyban.

Az iszkémiás stroke során fellépő érelzáródást általában az agyi artériás rendszerbe jutott vérrög okozza. Az agyi erek elzáródásának következtében rendkívül gyorsan kialakul az oxigén- és glükózhiányos állapot, és az agyban kialakul a betegségre jellemző három jellegzetes terület, az iszkémiás mag, az átmeneti vagy penumbra régió és az ép idegszövet (3. Ábra). Az oxigénhiány által legsúlyosabban érintett idegsejtek az iszkémiás magban találhatóak és itt a legnagyobb mértékű a stroke okozta szöveti elhalás mértéke, ezek a sejtek néhány percen belül elpusztulnak. A stroke-ban érintett artéria ellátási területének határán egy penumbrának nevezett átmeneti régió jön létre, amely kis mértékben képes energiaigényét más erekből fedezni, hosszabb távon azonban ez elégtelen a sejtek működéséhez (szekunder sérülés). Ezen a területen a szöveti károsodás lassabb ütemben fejlődik ki, ezért az itt található idegsejtek gyors, célzott és hatékony terápiás kezelés mellett még megmenthetők (Mehta et al., 2007).



3. Ábra TTC festéssel fehér régióként tűnik fel az iszkémiás stroke által érintett agyterület. Többszörös immunhisztokémiai jelöléssel a stroke határzónájában megfigyelhető az iszkémiás mag, az átmeneti zóna (penumbra) és az egészséges agyterület, illetve az itt található idegsejtek (MAP2) és mikroglia sejtek (CX3CR1) (Cserép et al., 2019).

Az iszkémiás stroke kezelésére trombolitikus hatású gyógyszert alkalmaznak, ami képes lebontani a kialakult vérrögöt. Azonban a beavatkozás sikerességének érdekében a betegnek a tünetek megjelenését követő 4,5 órán belül meg kell kapnia a kezelést (Fukuta et al., 2017). Amennyiben a páciens nem kerül kórházba az említett időablakon belül és a vérrög továbbra sem oldódik fel, akkor mechanikus trombektómia útján katéter segítségével szüntetik meg az érelzáródást (Chapman et al., 2014). Minél gyorsabban sikerül helyreállítani az agyi vérkeringést, annál kisebb területen halnak el az idegsejtek, ezáltal csökkentve a kórkép okozta maradandó károsodást.

A mikroglia sejtek iszkémiás stroke során betöltött neuroprotektív szerepének igazolásához fontos áttörést hozott a csoportvezetőm által közölt tanulmány. A kísérlet során megvizsgálták, hogy mikroglia sejtek hiányában a kísérletesen előidézett stroke jelentősen nagyobb területen okozott szöveti károsodást felnőtt egerek agyában. Feltehetően a mikroglia sejtek az átmenetileg oxigénhiányban szenvedő idegsejtekhez toborzódnak az átmeneti zónában, és segítik a túlélésüket stroke-os megbetegedés során (Szalay et al., 2016).

A stroke-os megbetegedések világméretű terhet jelentenek minden korosztály számára. A jelenleg rendelkezésre álló terápiás kezelések ellenére jelentősen magas a betegség halálozási rátája és a visszafordíthatatlan idegrendszeri károsodás kialakulásának valószínűsége. Ezért kiemelten fontos a sérülés kialakulásában szerepet játszó sejtes és molekuláris elemek teljes feltárása, ezáltal a stroke patofiziológiájának megértése egy új, célzott és hatékony terápiás kezelés kidolgozásának érdekében.

4. Célkitűzés

Évek óta szoros együttműködésben dolgozom az ELKH-hoz tartozó Kísérleti Orvostudományi Kutatóintézet (KOKI) Neuroimmunológia Kutatócsoportjával, ahol új megközelítésből kívánjuk vizsgálni a betegségek terápiájának lehetőségét, melynek alapja a központi idegrendszer saját védekezőképességének támogatása.

Elsődleges célunk ezért az agy fő immunsejtjének, a mikroglia működésének és funkciójának feltárása. A mikroglia sejtek a központi idegrendszer 10-15%-át kitevő szöveti makrofág sejtek, amik nagyrészt homogén eloszlást mutatnak az idegszövetben és bizonyítottan kiemelt szerepet játszanak az idegrendszert ért gyulladásozó folyamatokban, például a migrén, a stroke, az autizmus, az epilepszia, az Alzheimer-kór, a skizofrénia és a Parkinson-kór során. Figyelmünk középpontjában a mikroglia-idegsejt kapcsolat áll, melynek szerepe az egészséges idegrendszer kialakításában és fenntartásában alapvető fontosságú, de szerepet játszik számos neurodegeneratív folyamat során is. A közelmúltban kutatócsoportunk sikeresen bebizonyította, hogy létezik egy olyan kommunikációs útvonal a két sejt típus között, amely az irodalomban leírt szinaptikus idegsejt részeket érintő mikroglia nyúlványokhoz képest közvetlenebb és gyorsabb információáramlást biztosít. A közvetlen szomatikus kapcsolat rendkívül gyakori és általános jelenség, ami a mikroglia sejtek nyúlványa és az idegsejt sejttestje között jön létre. Kutatócsoportunk ezidáig sikeresen azonosított a kapcsolatban résztvevő számos molekuláris alkotóelemet, ami alapján elmondható, hogy a kapcsolat egyedülálló molekuláris ultrastruktúrával rendelkezik, amely kétirányú kommunikációt tesz lehetővé a sejtek között.

Kutatómunkám során ezt a korábban nem ismert kommunikációs felszínt vizsgálom, a mikroglia sejtek és az idegsejtek között. Kiemelt célom a kontaktus ultrastruktúrájának jobb megismerése és a kapcsolat kialakításában, illetve fenntartásában résztvevő, ezidáig nem azonosított fehérjék és molekuláris sejtorganellumok feltérképezése. A szomatikus mikroglia-idegsejt kapcsolatnak kiemelkedő szerepe lehet mind az idegsejtek fiziológiás működésének fenntartásában, mind pedig az idegrendszeri betegségek, mint például az iszkémiás stroke patofiziológiájában. Annak érdekében, hogy jobban megérthessük ezt az összetett rendszert, minél pontosabban meg kell ismernünk a kapcsolatban részt vevő molekulákat. Az újonnan azonosított szomatikus kapcsolat anatómiájának és működésének pontos felfedezése ugyanis hozzájárulhat az idegrendszert ért gyulladásozó folyamatok jobb megértéséhez, ezáltal célzott terápiás kezelések kidolgozásához.

5. Módszerek

5.1. Etikai állásfoglalás

A dolgozatomban szereplő kísérleteket a Kísérleti Orvostudományi Kutatóintézet Intézeti Etikai Kódexe, valamint a kísérleti állatok védelméről szóló hatályos nemzeti és EU-s törvények alapján végeztük, melyek egyetértésben vannak az Európai Közösség által 1986. november 24.-én elfogadott irányelvekkel (86/609/EEC). A KOKI Állatkísérleti Bizottsága, és a Fővárosi Állategészségügyi Bizottság a kísérleteket a PE/EA/1021-7/2019, PE/EA/673-7/2019 számokon engedélyezte. Minden kísérletünk összhangban volt az állatok védelméről és kíméletéről szóló hatályos magyar törvénnyel (1998; XXVIII, 243/1998) és az intézeti Munkahelyi Állatetikai Bizottság előírásaival.

5.2. Állatok

Kísérleteinkhez 12-18 hetes hím, C57Bl/6J vad típusú vagy mikroglia-riporter egereket használtunk. Utóbbi állatok mikroglia sejtjei endogén módon fejeznek ki zöld fluoreszcens fehérjét, mert a fraktalkin-receptort kódoló allélok közül az egyik zöld fluoreszcens fehérjét kódoló szekvenciára lett cserélve (CX3CR1^{GFP/+}). Az egerek szabadon fértek hozzá a táplálékhoz és a vízhez. Tartásuk során fokozott figyelem irányult a jól szabályozott fény-, páratartalom- és hőmérsékleti körülményekre.

5.3. Post mortem humán minták

A humán kontroll szövetminták két nő (59- és 60 évesek), illetve egy férfi (73 éves), ismert neurológiai betegséggel nem rendelkező és agyi elváltozáshoz nem köthető okból elhunyt páciensből származnak.

A stroke hatásának tanulmányozásához két női (77 és 78 évesek) és egy férfi (66 éves), arteria cerebri media érintettségű iszkémiás stroke-ot követően elhunyt páciensek szövetmintáit vizsgáltuk az ETT-TUKEB 62031/2015/EKU, 34/2016 és 31443/2011/EKU (518/PI/11) számú etikai engedélyek megléte mellett. A páciensek adatai az 1. Táblázatban találhatóak.

A szövetek kutatási célra történő felhasználása és a vizsgálatokhoz szükséges orvosi adatokhoz való hozzáférés tájékozott beleegyezés alapján történt. Továbbá a post mortem humán minták kezelése a Helsinkai Nyilatkozattal összhangban történt.

1. Táblázat A dolgozatban szereplő humán páciensek adatai

Páciens azonosítója	Nem	Életkor	Stroke-ot követő túlélés	Ismert komorbiditások	A halál oka
2011/0092	nő	77 év	2 nap	artériás hipertónia, T2DM, hipertireózis	stroke
2003/0029	férfi	66 év	1 nap	artériás hipertónia	stroke
2014/0050	nő	78 év	1 nap	ismeretlen	stroke
SKO3	nő	59 év	n.a.	iszkémiás kardiomiopátia	kardiogén sokk
SKO13	nő	60 év	n.a.	krónikus bronchitis	légzésleállás
SKO16	férfi	73 év	n.a.	ateroszklerózis, tüdőgyulladás	légzésleállás

5.4. In vivo beavatkozások és mérések

5.4.1. PSB beadás a cisterna magna-ba

A P2Y₁₂ receptor akut és szelektív gátlását célzó kísérleteink során az egerek cisterna magna-jába üveggapillárisal juttattunk 0,6 mg/ttkg fiziológiás sóoldatban oldott P2Y₁₂ receptor antagonistát, a PSB0739 (Tocris, R&D Systems, Minneapolis, USA) uridin-difoszfát vegyületet. A beadásra a reperfüzió kezdetekor került sor. Ezzel párhuzamosan a kontroll csoporthoz tartozó egerek agykamrájába azonos térfogatú fiziológiás sóoldatot juttattunk. Az oldatok agyi diffúzióját vitális festékek segítségével ellenőriztük. A műtétet és a PSB beadását a kutatócsoport munkatársai végezték.

5.4.2. Kísérletesen előidézett iszkémiás stroke

Az egyoldali arteria cerebri media elzárást intraluminalis filamentum technikával hajtották végre a kutatócsoport munkatársai. A kísérlet előtt az egerek izofluránnal kerültek altatásra. A nyaki régió kipreparálása után a bal oldali arteria carotis communison keresztül behelyeztünk egy szilikon-bevonatú monofilamentumot (210-230 µm hegyátmérő, Docol), majd az arteria carotis internán keresztül egészen az arteria cerebri mediaig vezetve elzártuk azt 30-45 percen keresztül. A sikeres okklúziót lézer Doppler (Moor Instruments) segítségével igazoltuk. A műtét során az állatok testhőmérsékletét szabályozott körülmények között, 37 ± 0.5°C között tartottuk. Kevesebb, mint 70%-os keringéscsökkenést, vérzést vagy az állat 24 órán belüli elhalálózását a kísérletből történő kizáró oknak tekintettük.

5.5. Minták előkészítése

Méréseinkhez a szöveti ultrastruktúrát jól megőrző perfúziós fixálást alkalmaztunk. Első lépésként az állatokat izofluránnal altattuk, majd intraperitoneálisan beadott 0,1-0,2 ml altató keverék (20 mg/ml ketamint, 4 mg/ml xylazin-hidrokloridot) befecskendezésével érzéstelenítettük az egereket. A mély alvás beálltát követően transzkardiális perfúzióra került sor egy percig fiziológias sóoldattal, majd huszonöt-harminc percig 4% frissen beoldott paraformaldehidet tartalmazó fixáló oldattal, ezt követően pedig 0,1 mólis foszfát-pufferrel (0,1 M PB) tíz percen keresztül. A perfúzió után az agyakat eltávolítottuk a koponyából, majd levágtuk a bulbus olfactorius-t és a kisagyat. Következő lépésként 50 µm-es koronális metszeteket készítettünk vibratóm segítségével (VT1200S, Leica, Németország), 0,1 M PB-ben. A metszeteket puffer oldatban, 4°C-on tároltuk, ha rövid időn belül felhasználásra kerültek, és 30%-os szacharóz-oldatban, -80°C-on, ha hosszabb tárolásra volt szükség. A dolgozatban leírt eredményekhez használt egerek transzkardiális perfúzióját a kutatócsoportban dolgozó munkatársak végezték el számomra.

5.6. TTC festés

Az iszkémiás penumbra meghatározásához fixálatlan agyszövetből 1 mm-es metszeteket készítettünk, majd 1% TTC-t (Sigma) tartalmazó foszfát pufferben inkubáltuk 37°C-os vízfürdőben, 20 percen keresztül. A mintákat ezután 4% paraformaldehidet tartalmazó (0,1 M PB) oldattal fixáltuk 24 órán át 4°C-on, majd vibratómmal újrametszettük.

5.7. Immunfluoreszcens hisztokémia

Az 50 µm-es agymetszeteket 0,1 M PB oldatban, majd tris-pufferelt fiziológias sóoldatban (TBS) rázókészülékre helyeztük. Az oldatokat meghatározott időnként cseréltük, és egy órán keresztül mostuk a metszeteket. Ezt követően a mintákat egy órán keresztül TBS-ben oldott 1%-os humán szérum albumin (HSA, Sigma) oldattal blokkoltuk (1% HSA és 0,3% Triton X-100 [Sigma]) az aspecifikus antitestkötődés csökkentése érdekében. Ezután a metszeteket az elsődleges antitesteket tartalmazó TBS oldatban inkubáltuk 24 órán át szobahőmérsékleten, vagy 48 órán át 4°C-on. Ezt követte a visszamaradó antitestek intenzív TBS-mosással való eltávolítása. A kísérletekben felhasznált elsődleges antitesteket a függelékben található 2. Táblázat tartalmazza.

A másodlagos antitesteket TBS oldatba helyeztük, majd ebben inkubáltuk a mintáinkat 4 órán keresztül. TBS mosást követő PB mosások segítségével eltávolítottuk a visszamaradó antitesteket, majd a tárgylemezre felvett metszeteket a sejtmagfestéshez szükséges, PB-ben oldott DAPI-val (Sigma) kezeltük és PB-mosások után Aqua-Poly/Mount-tal (Polysciences) fedtük. A kísérletekben felhasznált másodlagos antitesteket a függelékben található 3. Táblázat tartalmazza.

5.8. Konfokális mikroszkópia

5.8.1. Képkalkotás konfokális lézer-pásztázó mikroszkóppal

Konfokális lézer-pásztázó mikroszkópos vizsgálatainkhoz Nikon Eclipse Ti-E fordított mikroszkópot (Nikon Instruments Europe B.V.) használtunk. A nagyfelbontású képkalkotáshoz CFI Plan Achromat VC 60x olaj immerziós (numerikus apertúra: 1,4) objektívet és A1R konfokális rendszert használtunk. A gerjesztésre 405, 488, 561 és 647 nm hullámhosszú lézereket alkalmaztunk (CVI Melles Griot). A felvételek rögzítését és kezelését NIS Elements AR szoftverrel (Nikon Instruments Europe B.V.) végeztük.

5.8.2. Idegsejtek mikroglialis borítottságának mérése

A mikroglialis borítottság méréséhez olyan konfokális képsorozatokot használtunk (50 nm/pixel XY-irányú felbontás, 300 nm képsíkok közötti Z-irányú felbontás) amiken neuronális és mikroglia jel volt. A lemért idegsejteket véletlenszerűen választottuk ki úgy, hogy azok sejttestje minden síkban hiánytalanul látszódjon. A sejttesteket 3 dimenzióban rekonstruáltuk és a sejttest területét meghatároztuk minden képsíkon. Ezután bekapcsoltuk a mikroglialis jelet tartalmazó csatornát is és szintén minden síkon megmértük, hogy mekkora felületen érintkezik egymással a két sejt. A borítottságot ezután az adott sejttest méretének százalékos arányában adtuk meg.

5.8.3. Stroke-os szöveten végzett anatómiai vizsgálatok

Az iszkémiás stroke hatásainak tanulmányozására olyan egerek agyszövetmintáit használtuk, amik esetében 1 órás érelzárást 4 órás reperfüziós időszak követett.

5.8.4. Mitokondriális fragmentáció mérése

A mitokondriális fragmentáció vizsgálatához Kv2.1 és TOM20 fluoreszcens jellel ellátott metszeteket használtunk, amelyeket a penumbrából és az annak megfelelő ellenoldali (kontralaterális), stroke által nem érintett ép régióból vettük (kontroll). A Kv2.1 jelölés

segítségével azonosított piramissejtek sejttestjeinek legnagyobb keresztmetszetét tartalmazó képsíkon a sejtek membránjának körvonalát használtuk vizsgálandó területként. Ezeken a területeken belül a FIJI szoftver „Analyze Particles” funkciójával automatikusan nagyszámú mitokondriumot azonosíthattunk a TOM20 jelölést használva, és a program az azonosított mitokondriumok területét, valamint leghosszabb átmérőjét is képes volt automatikusan megadni.

5.8.5. Kv2.1 klaszterek mérése

A Kv2.1 klaszterek analíziséhez az előző pontnak megfelelő területeken végeztük méréseinket. Az idegsejtek körvonala mentén a Kv2.1 jel intenzitásgörbéjét FIJI szoftverrel exportáltuk, majd Microsoft Excel szoftver segítségével elemeztük. Azt tekintettük klaszternek, ha a fluoreszcens intenzitás legalább három szomszédos pixelen keresztül, legalább 25 szűrkeségértékkel (egy 8-bites kép átfogásának kb. 10%-a) meghaladta az adott sejtre jellemző átlagos fluoreszcens intenzitást.

5.8.6. C1q és connexin fehérjék mérése

A C1q, CX43, illetve a CX46 fehérjék szomatikus mikroglia-idegsejt kapcsolat területén való előfordulásának vizsgálatához a penumbra, valamint kontroll régiókból azonos beállítások mellett készítettük el a felvételeinket. Az analízist NIS szoftver segítségével végeztük el, amihez első lépésként csak a mikroglialis, illetve a neuronális jelek csatornáit bekapcsolva véletlenszerűen választottuk ki a megfelelő számú vizsgálni kívánt mikroglia-idegsejt kapcsolatokat. Ezután bekapcsoltuk a vizsgálandó fehérjéhez tartozó csatornát is és megállapítottuk, hogy a kijelölt kapcsolatokban megtalálható-e a keresett molekula vagy sem.

5.9. Statisztika

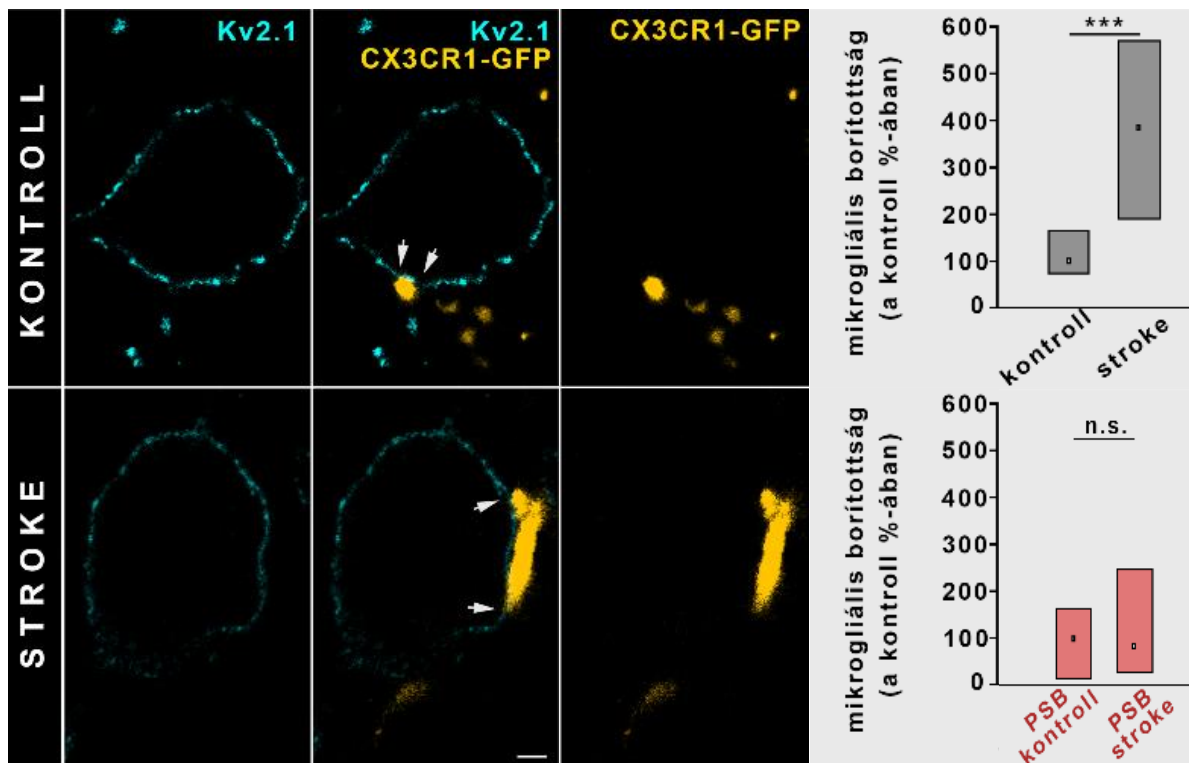
Minden kvantitatív mérésünket vak módszerrel végeztük. Az adatok típusának és eloszlásuknak megfelelően (a normalitásvizsgálatot Shapiro-Wilks W teszttel végeztük) választottunk statisztikai próbát: a normál eloszlású mintákon kétmintás t-tesztet hajtottunk végre, míg nem parametrikus, független csoportok esetén Mann-Whitney U tesztet végeztünk. A dolgozat során a szignifikanciaszintet minden esetben $\alpha = 0,05$ -ben határoztuk meg. A statisztikai analízishez Statistica 13.4.0.14 szoftvert (TIBCO) használtunk.

6. Eredmények

6.1. A penumbra régióban megnövekszik az idegsejtek mikroglialis borítottsága iszkémiás stroke-ot követően

Iszkémiás stroke-on átesett egerek penumbra régiójában lejátszódó jelenségek vizsgálatára kutatócsoportunk tagjai kísérletesen idéztek elő iszkémiás stroke-ot, az egyik oldali arteria cerebri media elzárásával. Ezután a penumbra, illetve az ennek megfelelő kontralaterális agykérgi régióból készített metszetekről 3 dimenziós rekonstruált felvételeket készítettünk konfokális fluoreszcens mikroszkóp segítségével (4. Ábra). Azt tapasztaltuk, hogy a penumbra régióban az állatok idegsejtjeinek mikroglialis borítottsága jelentősen megnövekedett [kontroll: 100% (74,85–163,27) (medián és interkvartilis tartomány); stroke: 384,1% (186,95–567,68), $n = 36$ sejt (2 állat); $p < 0,0001$].

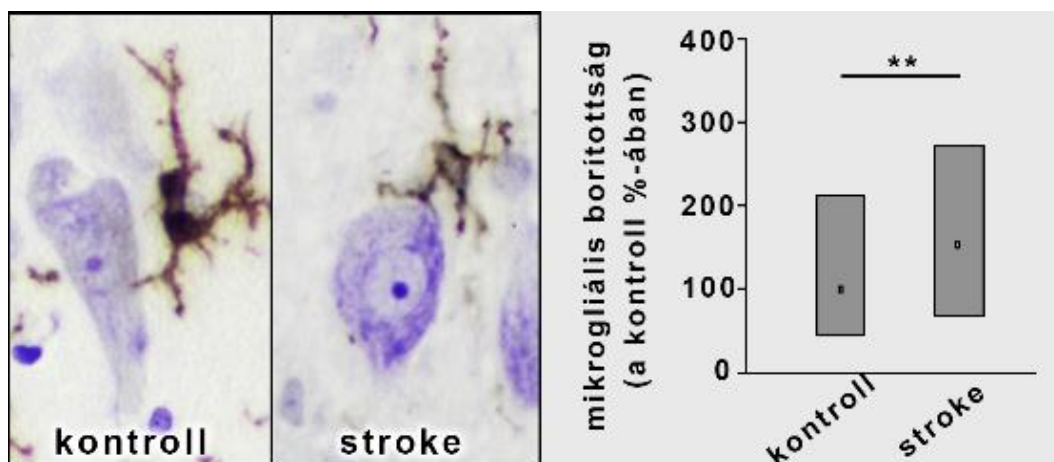
Ezután megvizsgáltuk a P2Y₁₂ receptorokat szelektíven és akután gátló PSB hatását stroke-on átesett egerekben. Ebben az esetben azonban nem tapasztaltunk megnövekedett mikroglialis borítottságot az idegsejtek felszínén [PSB kontroll borítottság: 100% (12,71–68,02) (medián és interkvartilis tartomány); PSB stroke: 84,37% (27,94–249,82); $n = 31$ sejt (2 állat); $p = 0,7952$].



4. Ábra A penumbrában található neuronok (Kv2.1) sejtestének felszínén megnövekszik a mikroglialis (CX3CR1-GFP) borítottság. Méretvonal: 2 μ m. (Cserép et al., 2019)

Feltételezhető tehát, hogy a P2Y₁₂ receptor esszenciális szerepet játszik a mikroglia sejtek által az oxigénhiány miatt sérült idegsejtek állapotára adott neuroprotektív válaszreakcióban.

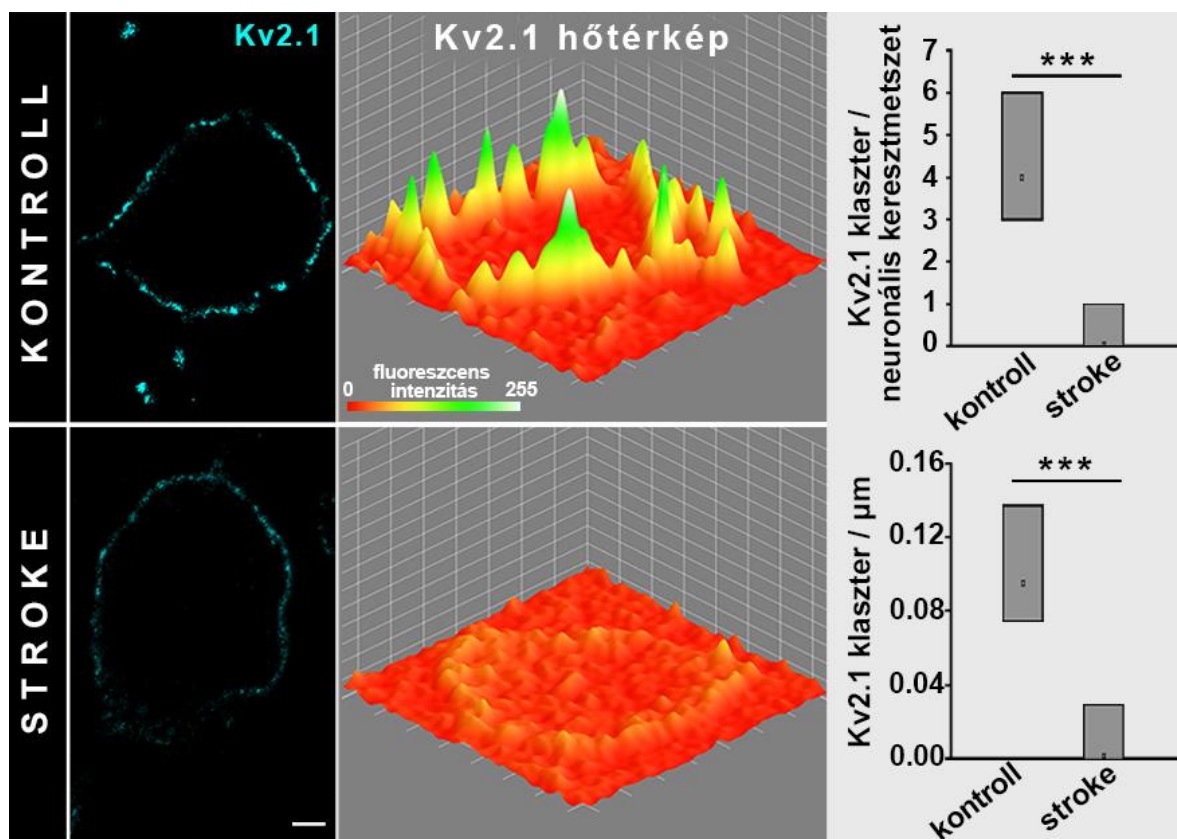
Eredményeink transzlációs jelentőségének jobb megértése érdekében a megfigyelt jelenséget stroke-on átesett páciensek post mortem agyszöveti mintáin is megvizsgáltuk. Az egerekben látottakat alátámasztotta, hogy a stroke-ban elhunyt emberek penumbra régiójában is lényegesen nagyobb volt az idegsejtek mikroglialis borítottsága, mint az egészséges idegszövetben (5. *Ábra*) [kontroll: 100% (44,78–213,11) (medián és interkvartilis tartomány); stroke: 153,16% (66,99– 273,38), $n = 249$ sejt (6 páciens); $p < 0,001$].



5. *Ábra* Stroke-ban elhunyt páciensek post mortem agyszöveti mintáin szintén megfigyelhető az idegsejtek (krezil-ibolya festés) megnövekedett mikroglialis (DAB-csapadék) borítottsága a penumbra régió területén. Méretvonal: 10 μ m. (Cserép et al., 2019)

6.2. Iszkémiás stroke következtében a Kv2.1 klaszterek feloszlanak az idegsejt membránjában

Kíváncsiak voltunk arra is, hogy stroke hatására milyen változások játszódnak le a szomatikus mikroglia-idegsejt kapcsolatban. Azt találtuk, hogy a fizioiógias körülmények között a neuronális membránban található Kv2.1 klaszterek stroke során feloszlanak a membránban (6. *Ábra*) [Kv2.1 klaszter/neuronális keresztmetszet: kontroll: 4 (3-6) (medián és interkvartilis tartomány), stroke: 0 (0-1); $p < 0,0001$. Kv2.1 klaszter/ μ m: kontroll: 0,0947 (0,0743–0,1365), stroke: 0 (0–0,0296), $n = 58$ sejt (2 állat); $p < 0,0001$]. Ez a megfigyelésünk egybecseng az irodalmi adatokkal, mely szerint neuronokat érő káros behatás következtében a Kv2.1 klaszterek eltűnnek, a fehérje homogénen eloszlik a membránban.

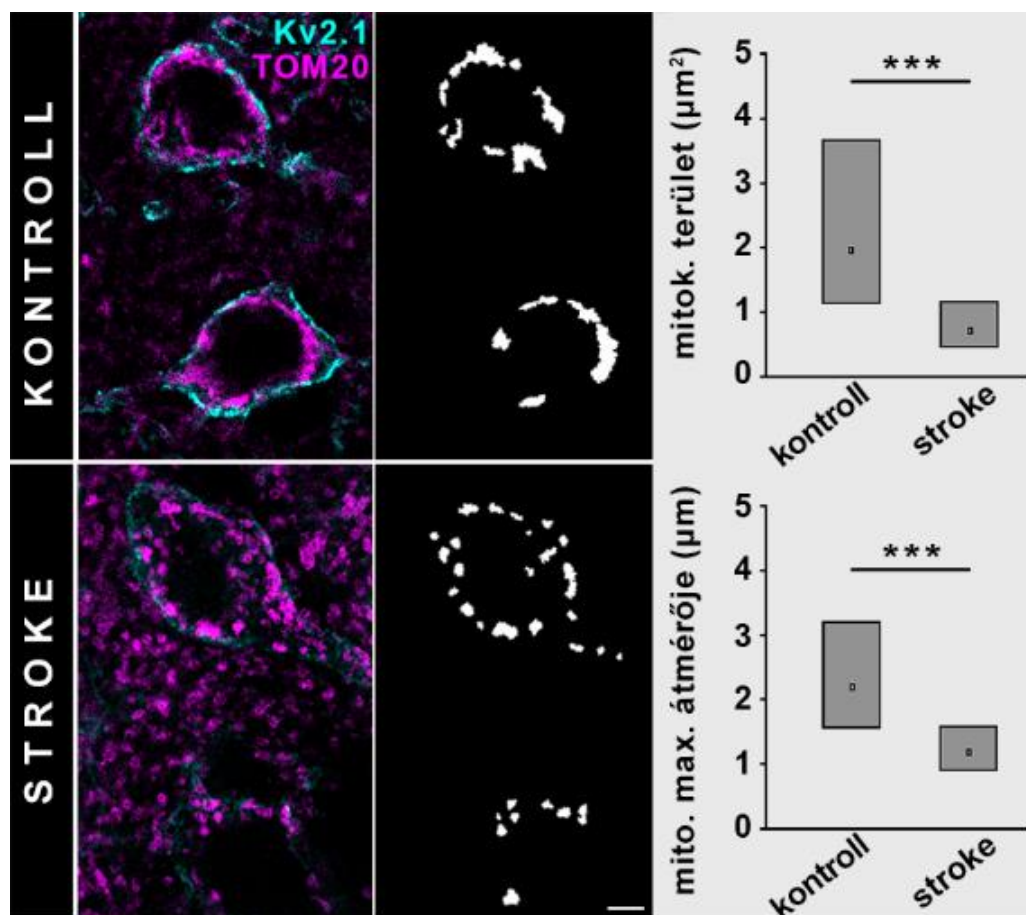


6. Ábra Kísérletesen előidézett ischemiás stroke hatására az elhalt agyterületek határzónájában (penumbra) az idegsejtek membránjában eltűnnek a Kv2.1 csoportosulások (cián). Méretvonal: 2 μm . (Cserép et al., 2019)

6.3. A neuronális mitokondriumok fragmentációja figyelhető meg oxigénhiányos körülmények között

További vizsgálataink során azt is megfigyeltük, hogy a stroke-on átesett állatok penumbra régiójában az idegsejtek sejttestében található mitokondriumok fragmentálódnak, amely a működésük zavarához vezethet (7. Ábra) ([kontroll mitokondriális terület: 1,97 μm^2 (1,14–3,67) (medián és interkvartilis tartomány); stroke: 0,71 μm^2 (0,46–1,16); kontroll legnagyobb mitokondriális átmérő: 2,19 μm (1,58–3,16) (medián és interkvartilis tartomány); stroke: 1,18 μm (0,91–1,58), $n = 189$ sejt (2 állat); $p < 0,0001$].

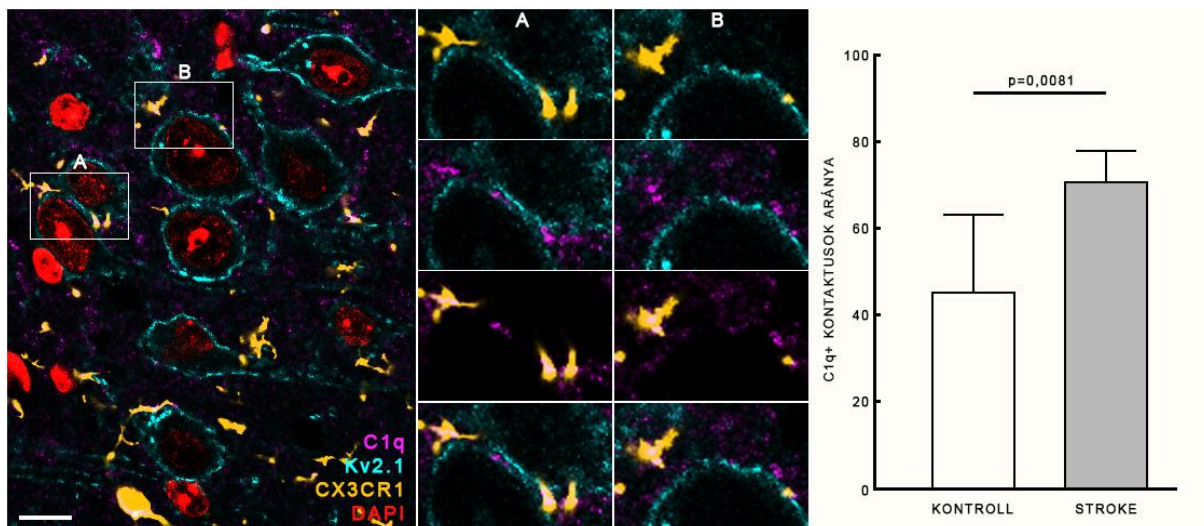
Az eddigiekben ismertetett kísérletek alapján elmondható tehát, hogy stroke hatására a szomatikus mikroglia-neuron kapcsolat struktúrája alapvetően megváltozik.



7. Ábra Az idegsejtek citoplazmájában a mitokondriumok (TOM20) fragmentálódnak a penumbra régióban. Méretvonal: 4 μm. (Cserép et al., 2019)

6.4. A C1q fehérjét tartalmazó szomatikus kapcsolatok aránya jelentősen megnövekszik a penumbrában

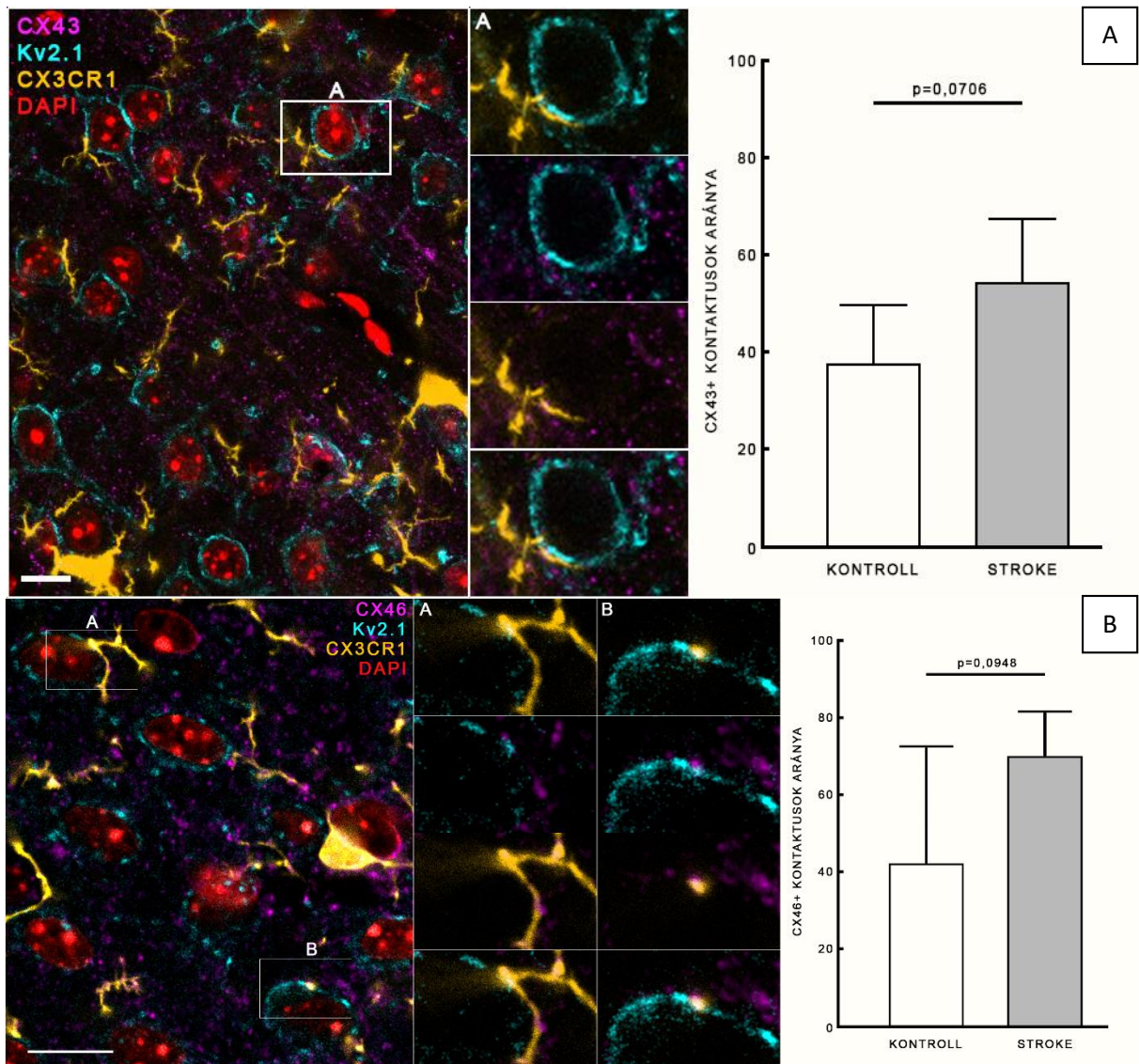
A C1q konfokális mikroszkóppal történő vizsgálata során azt tapasztaltuk, hogy az általunk vizsgált mikroglia-idegsejt kapcsolatok egy részében is jelen van ez a fehérje. A C1q mikroglia nyúlványban való megoszlása, illetve a szomatikus kapcsolatban betöltött funkciója ezidáig ismeretlen volt, ezért további kísérleteink során megvizsgáltuk, hogy iszkémiás stroke-on átesett egerek esetében hogyan változik a C1q előfordulása a mikroglia-idegsejt kapcsolatban. Ennek eredményeként azt figyeltük meg, hogy a penumbra területén jelentős mértékben megnövekedett a C1q jelöléssel ellátott szomatikus mikroglia-idegsejt kapcsolatok aránya (8. ábra) [kontroll: 45,10% (±18,15%) (átlag ±standard deviáció); stroke: 70,66% (±7,19%), $n = 333$ kontaktus (6 állat); $p = 0,0081$].



8. Ábra Iszkémiás stroke átmeneti zónájában a C1q fehérje (C1q) gyakrabban mutatható ki a mikroglia (CX3CR1) –idegsejt (Kv2.1) kapcsolatokban. Méretvonal:10 μ m.

6.5. Stroke-ot követően a connexin fehérjék nagyobb számban található meg a mikroglia-idegsejt kapcsolatokban

Kísérleteink során azt is megfigyeltük, hogy az oxigénhiány által leginkább érintett iszkémiás mag és az ép idegszövet határán található átmeneti zónában a CX43, illetve a CX46 fehérjéket tartalmazó szomatikus mikroglia-neuron kontaktusok aránya egyaránt megnövekszik a mikroglia-idegsejt kapcsolatokban (9. Ábra) [CX43 kontroll: 37,50% (\pm 12,16%) (átlag \pm standard deviáció); CX43 stroke: 54,24% (\pm 13,22%), $n = 190$ kontaktus (3 állat); $p = 0,0706$; CX46 kontroll: 41,98% (\pm 30,62%) (átlag \pm standard deviáció); CX46 stroke: 69,78% (\pm 11,83%), $n = 267$ kontaktus (5 állat); $p = 0,0948$].



9. Ábra A szomatikus mikroglia-idegsejt kapcsolatok nagyobb arányban tartalmaznak CX43 (A) és CX46 (B) fehérjéket a penumbra régióban. Méretvonal: 10 μ m.

7. Diszkusszió

Központi idegrendszerünk védelme kiemelten fontos és óriási kihívást jelentő feladat, hiszen agyunk a szisztémás keringéstől és a perifériás immunrendszertől elszigetelt szerv. Az itt kialakuló gyulladáshoz és fertőzéses folyamatokkal szemben elsősorban az agy legfőbb immunsejtje, a mikroglia képes hatékonyan fellépni. A mikroglia sejtek folyamatos minőségellenőrző munkája elengedhetetlen az idegsejtjeink egészséges működésének fenntartása érdekében, ehhez pedig szükség van egy rendkívül gyors és hatékony kommunikációs útvonal létrejöttére a két sejt típus között. Mivel a szélsőségesen polarizált idegsejtek működése és túlélése szempontjából legfontosabb mechanizmusok a sejt magot is tartalmazó sejttestben mennek végbe, kézenfekvőnek tűnik, hogy a mikroglia itt próbáljon beavatkozni a neuronális folyamatokba.

Ezzel összhangban, kutatócsoportunkban sikeresen megfigyeltünk egy korábban nem ismert kapcsolatot a hippocampus és a neokortex területén, ami sejt típusától függetlenül nagyon gyakran alakul ki a mikroglia sejtek nyúlványa és az idegsejt sejttestje között. Fiziológiai körülmények között a közvetlen szomatikus kapcsolat az idegsejtek döntő többségén megtalálható egérben és emberben egyaránt, ami arra utal, hogy a kapcsolat evolúciósan konzervált jelenség, így molekuláris ultrastruktúrájának feltérképezése, valamint működésének pontos megértése ígéretes áttörést hozhat a neurodegeneratív betegségek terápiáját célzó gyógyszerkutatások területén.

A közvetlen szomatikus kontaktus molekuláris szerkezetének vizsgálata során a kapcsolat számos állandó szereplőjét sikeresen azonosítottuk. Az idegsejt oldaláról a Kv2.1 fehérjét, a neuronális sejttestben a kapcsolat területén kihorgonyozott mitokondriumokat és purinerg vezikulákat, illetve a mikroglialis membránban található P2Y₁₂ receptorokat. Ezek a fehérjék és sejtalkotók gyakorlatilag minden szomatikus mikroglia-idegsejt kapcsolatban megfigyelhetők, és kétirányú kommunikációt tesznek lehetővé a sejtek között. Legújabb vizsgálataink során azonban olyan fehérjéket is azonosítottunk, amelyek a kapcsolatok nagyjából felében vannak csak jelen, ami valószínűsíti a szomatikus kontaktusok közti funkcionális heterogenitást. Feltételezhető tehát, hogy nem minden szomatikus mikroglia-idegsejt kapcsolatnak ugyanaz a szerepe, hanem más-más feladatra specializálódnak.

Az iszkémiás stroke során bekövetkező idegsejt-pusztulás nagyban függ a terápia megkezdéséig eltelt időtől. Az idegsejtek magas energiaigényük miatt a vérrellátás megszűnését követően gyorsan elhalnak az iszkémiás mag területén, azonban ennek hatásán, az átmeneti

zónában olyan sejtek vannak, amelyek fiziológias állapota megfelelő körülmények között visszaállítható. Korábbi kísérletek bebizonyították, hogy a mikroglia sejtek neuroprotektív szerepet töltenek be iszkémiás stroke-ot követően, így kutatómunkánk során a szomatikus mikroglia-idegsejt kapcsolat molekuláris felépítésének iszkémiás stroke során történő megváltozására, ezzel együtt pontos funkciójának jobb megértésére törekedtünk. Megfigyeltük, hogy a kontaktus számos strukturális változáson megy keresztül az iszkémiás mag és az ép szövet határán létrejövő penumbra régióban, ahol az oxigén-hiány által érintett, de potenciálisan még megmenthető idegsejtek találhatók: az idegsejtek membránjában fellelhető Kv2.1 csoportosulások feloszlanak, a mitokondriumok fragmentálódnak a citoplazmában, továbbá a sejtest felszínén megnövekszik a mikroglialis borítottság, ami P2Y12 receptor-függő módon megy végbe. A strukturális változások hatására a fiziológias mikroglia-neuron kommunikáció ellehetetlenül, és a mindenkori terápiás megközelítésnek ezen állapot visszaállítását kell elsődlegesen céloznia. Az egérben tett megfigyelések transzlációs jelentőségét erősíti, hogy a mikroglialis borítottság-növekedést megfigyeltük stroke-ban elhunyt páciensek post mortem agyszöveti mintáin is.

Az újonnan azonosított fehérjék fiziológias körülmények között a kapcsolatok mindössze körülbelül 40-45%-ában találhatók meg. A komplement rendszer egyik fontos alkotóeleme, a C1q fehérje fiziológias körülmények között a kontaktok 45%-ában figyelhető meg, stroke hatására azonban ez a szám jelentősen megnövekszik és a mikroglia sejtek a kapcsolatok mintegy 71%-át jelölik meg C1q fehérjével. Megfigyelésünk összhangban áll a C1q traumás agysérülést követő szekunder károsodásban bizonyítottan betöltött szerepével és feltételezhető, hogy az oxigénhiány okozta szöveti károsodás krónikus hatásaival lehet összefüggésben. A C1q bizonyosan jelzéseként szolgál a mikroglia-idegsejt kapcsolatban, azonban ennek neuroprotektív vagy éppen destruktív vonatkozásait kizárólag funkcionális kísérletek során érthetjük meg.

A connexin típusú molekulák közül vizsgált CX43 és CX46, a fiziológias körülmények között megfigyelt kapcsolatok körülbelül 40%-ában fordulnak elő, de a penumbra régióban szintén megemelkedett számban találhatók meg. Ezen csatornák jelenléte a neuronokból kiáramló ATP szempontjából kulcsfontosságú, ugyanis míg a fiziológias körülmények között felszabaduló, kis mennyiségű ATP kemotaktikus ingerként szolgál a mikroglia számára azok P2Y12 receptorain keresztül, addig a patológias körülmények közötti, nagyságrendekkel nagyobb ATP-kiáramlás gátolja a mikroglialis működést, és az idegsejtek apoptózisához vezethet. Az ATP-kiáramlás útvonalának megismerése kulcsfontosságú, mert amennyiben

sikerülne meggátolni azt, azzal tovább maradhatnak életképesek a penumbra régióban található idegsejtek, javítva ezzel a terápiás kilátásokat.

Eredményeinkből látható, hogy a mikroglia sejtek képesek dinamikusan monitorozni az idegsejtek állapotát és gyors választ adni a neuronális működésben bekövetkező változásokra a közvetlen szomatikus kapcsolaton keresztül. Reményeink szerint munkánk segít közelebb kerülni a kapcsolat anatómiai struktúrájának, illetve pontos funkciójának feltárásához fiziológias és patológias körülmények között, ezáltal a gyulladásos idegrendszeri megbetegedésekben lejátszódó folyamatok jobb megértéséhez és egy új, mikrogliaát célzó hatékony terápiás szemlélet kidolgozásához.

8. Irodalomjegyzék

- Aarum, J., Sandberg, K., Haeberlein, S. L. B., & Persson, M. A. (2003). Migration and differentiation of neural precursor cells can be directed by microglia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *100*(26), 15983–15988.
- Amarenco, P., Bogousslavsky, J., Caplan, L. R., Donnan, G. A., Wolf, M. E., & Hennerici, M. G. (2013). The ASCOD phenotyping of ischemic stroke (Updated ASCO Phenotyping). *Cerebrovascular Diseases*, *36*(1), 1–5.
- Anderson, R. M., Hadjichrysanthou, C., Evans, S., & Wong, M. M. (2017). Why do so many clinical trials of therapies for Alzheimer’s disease fail? *The Lancet*, *390*(10110), 2327–2329.
- András Szarka. (2014). *Biokémia II*. Typotex Kiadó.
- Basilico, B., Angelantonio, S. Di, & Pape, C. (2021). Microglia complement signaling promotes neuronal elimination and normal brain functional connectivity. *BioRxiv Neuroscience*.
- Bilimoria, P. M., & Stevens, B. (2015). Microglia function during brain development: New insights from animal models. *Brain Research*, *1617*, 7–17.
- Butovsky, O., Jedrychowski, M. P., Moore, C. S., Cialic, R., Lanser, A. J., Gabriely, G., Koeglsperger, T., Dake, B., Wu, P. M., Doykan, C. E., Fanek, Z., Liu, L., Chen, Z., Rothstein, J. D., Ransohoff, R. M., Gygi, S. P., Antel, J. P., & Weiner, H. L. (2014). Erratum: Identification of a unique TGF- β -dependent molecular and functional signature in microglia (Nature Neuroscience (2014) 17 (131-143)). *Nature Neuroscience*, *17*(9), 1286.
- Carniglia, L., Ramírez, D., Durand, D., Saba, J., Turati, J., Caruso, C., Scimonelli, T. N., & Lasaga, M. (2017). Neuropeptides and Microglial Activation in Inflammation, Pain, and Neurodegenerative Diseases. *Mediators of Inflammation*, *2017*, 5048616.
- Chang, M. C., Srinivasan, K., Friedman, B. A., Suto, E., Modrusan, Z., Lee, W. P., Kaminker, J. S., Hansen, D. V., & Sheng, M. (2017). Progranulin deficiency causes impairment of autophagy and TDP-43 accumulation. *Journal of Experimental Medicine*, *214*(9), 2611–2628.
- Chapman, S. N., Mehndiratta, P., Johansen, M. C., McMurry, T. L., Johnston, K. C., & Southerland, A. M. (2014). Current perspectives on the use of intravenous recombinant tissue plasminogen activator (tPA) for treatment of acute ischemic stroke. *Vascular Health and Risk Management*, *10*, 75–87.
- Chen, W. W., Zhang, X., & Huang, W. J. (2016). Role of neuroinflammation in neurodegenerative diseases (Review). *Molecular Medicine Reports*, *13*(4), 3391–3396.
- Chew, S. S. L., Johnson, C. S., Green, C. R., & Danesh-Meyer, H. V. (2010). Role of connexin43 in central nervous system injury. *Experimental Neurology*, *225*(2), 250–261.
- Cho, K. (2019). Emerging Roles of Complement Protein C1q in Neurodegeneration. *Aging and Disease*, *10*(3), 652.
- Chu, Y., Jin, X., Parada, I., Pesic, A., Stevens, B., Barres, B., & Prince, D. A. (2010). Enhanced synaptic connectivity and epilepsy in C1q knockout mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *107*(17), 7975–7980.

- Cserép, C., Pósfai, B., & Dénes, Á. (2020). Shaping Neuronal Fate: Functional Heterogeneity of Direct Microglia-Neuron Interactions. *Neuron*, *109*(2), 222–240.
- Cserép, C., Pósfai, B., Lénárt, N., Fekete, R., László, Z. I., Lele, Z., Orsolits, B., Molnár, G., Heindl, S., Schwarcz, A. D., Ujvári, K., Környei, Z., Tóth, K., Szabadits, E., Sperlágh, B., Baranyi, M., Csiba, L., Hortobágyi, T., Maglóczky, Z., Martinecz, B., Szabó, G., Erdélyi, F., Szipócs, R., Tamkun, M. M., Gesierich, B., Duering, M., Katona, I., Liesz, A., Tamás, G., & Dénes, Á. (2019). Microglia monitor and protect neuronal function via specialized somatic purinergic junctions. *Science*, *367*(6477), 528–537.
- Cunningham, C. L., Martinez-Cerdeno, V., & Noctor, S. C. (2013). Microglia Regulate the Number of Neural Precursor Cells in the Developing Cerebral Cortex. *Journal of Neuroscience*, *33*(10), 4216–4233.
- Dalmau, I., Finsen, B., Zimmer, J., González, B., & Castellano, B. (1998). Development of microglia in the postnatal rat hippocampus. *Hippocampus*, *8*(5), 458–474.
- Davalos, D., Grutzendler, J., Yang, G., Kim, J. V., Zuo, Y., Jung, S., Littman, D. R., Dustin, M. L., & Gan, W. B. (2005). ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. *Nature Neuroscience*, *8*(6), 752–758.
- Decrock, E., De Bock, M., Wang, N., Bultynck, G., Giaume, C., Naus, C. C., Green, C. R., & Leybaert, L. (2015). Connexin and pannexin signaling pathways, an architectural blueprint for CNS physiology and pathology? *Cellular and Molecular Life Sciences*, *72*(15), 2823–2851.
- Degan, D., Ornello, R., Tiseo, C., Carolei, A., Sacco, S., & Pistoia, F. (2018). The Role of Inflammation in Neurological Disorders. *Current Pharmaceutical Design*, *24*(14), 1485–1501.
- Delvaeye, T., Vandenabeele, P., Bultynck, G., Leybaert, L., & Krysko, D. V. (2018). Therapeutic Targeting of Connexin Channels: New Views and Challenges. *Trends in Molecular Medicine*, *24*(12), 1036–1053.
- Deutsch, E., Weigel, A. V., Akin, E. J., Fox, P., Hansen, G., Haberkorn, C. J., Loftus, R., Krapf, D., & Tamkun, M. M. (2012). Kv2.1 cell surface clusters are insertion platforms for ion channel delivery to the plasma membrane. *Molecular Biology of the Cell*, *23*(15), 2917–2929.
- Erblich, B., Zhu, L., Etgen, A. M., Dobrenis, K., & Pollard, J. W. (2011). Absence of colony stimulation factor-1 receptor results in loss of microglia, disrupted brain development and olfactory deficits. *PloS One*, *6*(10), e26317.
- Eugenín, E. A., Eckardt, D., Theis, M., Willecke, K., Bennett, M. V. L., & Sáez, J. C. (2001). Microglia at brain stab wounds express connexin 43 and in vitro form functional gap junctions after treatment with interferon- γ and tumor necrosis factor- α . *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *98*(7), 4190–4195.
- Fox, P. D., Haberkorn, C. J., Akin, E. J., Seel, P. J., Krapf, D., & Tamkun, M. M. (2015). Induction of stable ER-plasma-membrane junctions by Kv2.1 potassium channels. *Journal of Cell Science*, *128*(11), 2096–2105.
- Fukuta, T., Asai, T., Yanagida, Y., Namba, M., Koide, H., Shimizu, K., & Oku, N. (2017). Combination therapy with liposomal neuroprotectants and tissue plasminogen activator for treatment of ischemic stroke. *FASEB Journal*, *31*(5), 1879–1890.

- Ginhoux, F., Greter, M., Leboeuf, M., Nandi, S., See, P., Gokhan, S., Mehler, M. F., Conway, S. J., Ng, L. G., Stanley, E. R., Samokhvalov, I. M., & Merad, M. (2010). Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. *Science (New York, N.Y.)*, *330*(6005), 841–845.
- Gullstrand, B., Mårtensson, U., Sturfelt, G., Bengtsson, A. A., & Truedsson, L. (2009). Complement classical pathway components are all important in clearance of apoptotic and secondary necrotic cells. *Clinical and Experimental Immunology*, *156*(2), 303–311.
- Hankey, G. J. (2017). Stroke. *The Lancet*, *389*(10069), 641–654.
- Haynes, S. E., Hollopeter, G., Yang, G., Kurpius, D., Dailey, M. E., Gan, W. B., & Julius, D. (2006). The P2Y₁₂ receptor regulates microglial activation by extracellular nucleotides. *Nature Neuroscience*, *9*(12), 1512–1519.
- Holden, S. S., Grandi, F. C., Aboubakr, O., Higashikubo, B., Cho, F. S., Chang, A. H., Forero, A. O., Morningstar, A. R., Mathur, V., Kuhn, L. J., Suri, P., Sankaranarayanan, S., Andrews-Zwilling, Y., Tenner, A. J., Luthi, A., Aronica, E., Corces, M. R., Yednock, T., & Paz, J. T. (2021). Complement factor C1q mediates sleep spindle loss and epileptic spikes after mild brain injury. *Science*, *373*(6560).
- Iadecola C, A. J. (2011). Stroke research at a crossroad: asking the brain for directions. *Nat Neurosci*, *14*, 1363–1368.
- Kettenmann, H., Hanisch, U.-K., Noda, M., & Verkhratsky, A. (2011). Physiology of Microglia. *Physiological Reviews*, *91*(2), 461–553.
- Kierdorf, K., & Prinz, M. (2017). Microglia in steady state. *Journal of Clinical Investigation*, *127*(9), 3201–3209.
- Li, Q., & Barres, B. A. (2018). Microglia and macrophages in brain homeostasis and disease. *Nature Reviews Immunology*, *18*(4), 225–242.
- Lim, S.-H., Park, E., You, B., Jung, Y., Park, A.-R., Park, S. G., & Lee, J.-R. (2013). Neuronal synapse formation induced by microglia and interleukin 10. *PLoS One*, *8*(11), e81218.
- Llorente-Folch, I., Rueda, C. B., Pardo, B., Szabadkai, G., Duchon, M. R., & Satrustegui, J. (2015). The regulation of neuronal mitochondrial metabolism by calcium. *The Journal of Physiology*, *593*(16), 3447–3462. <https://doi.org/10.1113/JP270254>
- Ma et al. (2013). Remodeling of dendrites and spines in the C1q knockout model of genetic epilepsy. *Epilepsia*, *57*, 1232–1239.
- Mehta, S. L., Manhas, N., & Raghuram, R. (2007). Molecular targets in cerebral ischemia for developing novel therapeutics. *Brain Research Reviews*, *54*(1), 34–66.
- Mevorach, B. D., Mascarenhas, J. O., Gershov, D., & Elkon, K. B. (1998). Complement-dependent Clearance of. *Journal of Experimental Medicine*, *188*(12), 2313–2320.
- Miyamoto, A., Wake, H., Ishikawa, A. W., Eto, K., Shibata, K., Murakoshi, H., Koizumi, S., Moorhouse, A. J., Yoshimura, Y., & Nabekura, J. (2016). Microglia contact induces synapse formation in developing somatosensory cortex. *Nature Communications*, *7*, 12540.
- Monier, A., Adle-Biassette, H., Delezoide, A.-L., Evrard, P., Gressens, P., & Verney, C. (2007). Entry and distribution of microglial cells in human embryonic and fetal cerebral cortex. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, *66*(5), 372–382.

- Moriyama, Y., Hiasa, M., Sakamoto, S., Omote, H., & Nomura, M. (2017). Vesicular nucleotide transporter (VNUT): appearance of an actress on the stage of purinergic signaling. *Purinergic Signalling*, *13*(3), 387–404.
- Mosser, C.-A., Baptista, S., Arnoux, I., & Audinat, E. (2017). Microglia in CNS development: Shaping the brain for the future. *Progress in Neurobiology*, *149–150*, 1–20.
- Nagy, J. I., & Rash, J. E. (2000). Connexins and gap junctions of astrocytes and oligodendrocytes in the CNS. *Brain Research Reviews*, *32*(1), 29–44.
- Naus, C. C. G., Bechberger, J. F., Caveney, S., & Wilson, J. X. (1991). Expression of gap junction genes in astrocytes and C6 glioma cells. *Neuroscience Letters*, *126*(1), 33–36.
- Nauta, A. J., Trouw, L. A., Daha, M. R., Tijmsma, O., Nieuwland, R., Schwaeble, W. J., Gingras, A. R., Mantovani, A., Hack, E. C., & Roos, A. (2002). Direct binding of C1q to apoptotic cells and cell blebs induces complement activation. *European Journal of Immunology*, *32*(6), 1726–1736.
- Nimmerjahn, A., Kirchhoff, F., & Helmchen, F. (2005). Resting Microglial Cells Are Highly Dynamic Surveillants of Brain Parenchyma in Vivo — Resting Microglial Cells Are Highly Dynamic Surveillants of Brain Parenchyma in Vivo. *Science*, *308*(May), 1314–1319.
- Parkhurst, C. N., Yang, G., Ninan, I., Savas, J. N., Iii, J. R. Y., Lafaille, J. J., Hempstead, B. L., Littman, D. R., & Gan, W. (2014). Microglia promote learning-dependent synapse formation through BDNF. *Cell*, *155*(7), 1596–1609.
- Pio del Rio-Hortega. (1939). The Microglia. *The Lancet*, *233*, 1023–1026.
- Pont-Lezica, L., Beumer, W., Colasse, S., Drexhage, H., Versnel, M., & Bessis, A. (2014). Microglia shape corpus callosum axon tract fasciculation: functional impact of prenatal inflammation. *The European Journal of Neuroscience*, *39*(10), 1551–1557.
- Pósfai, B., Cserép, C., Orsolits, B., & Dénes, Á. (2018). New Insights into Microglia-Neuron Interactions: A Neuron’s Perspective. *Neuroscience*, *405*, 103–117.
- Ransohoff, R. M. (2016). How neuroinflammation contributes to neurodegeneration. *Science*, *353*(6301), 777–783.
- Reid, K. B. M. (2018). Complement component C1q: Historical perspective of a functionally versatile, and structurally unusual, serum protein. *Frontiers in Immunology*, *9*, 1–6.
- Rouach, N., Avignone, E., Mème, W., Koulakoff, A., Venance, L., Blomstrand, F., & Giaume, C. (2002). Gap junctions and connexin expression in the normal and pathological central nervous system. *Biology of the Cell*, *94*(7–8), 457–475.
- Salter, M. W., & Stevens, B. (2017). Microglia emerge as central players in brain disease. *Nature Medicine*, *23*(9), 1018–1027.
- Schafer, D. P., Lehrman, E. K., Kautzman, A. G., Koyama, R., Mardinly, A. R., Yamasaki, R., Ransohoff, R. M., Greenberg, M. E., Barres, B. A., & Stevens, B. (2012). Microglia Sculpt Postnatal Neural Circuits in an Activity and Complement-Dependent Manner. *Neuron*, *74*(4), 691–705.
- Söhl, G., & Willecke, K. (2003). An update on connexin genes and their nomenclature in mouse and man. *Cell Communication and Adhesion*, *10*(4–6), 173–180.

- Söhl, G., & Willecke, K. (2004). Gap junctions and the connexin protein family. *Cardiovascular Research*, *62*(2), 228–232.
- Söhl, Willecke, K., Eiberger, J., Degen, J., Eckardt, D., Romualdi, A., Güldenagel, M., Deutsch, U., & Goran. (2002). Structural and Functional Diversity of Connexin Genes in the Mouse and Human Genome. *Biological Chemistry*, *383*(5), 725–737.
- Squarzoni, P., Oller, G., Hoeffel, G., Pont-Lezica, L., Rostaing, P., Low, D., Bessis, A., Ginhoux, F., & Garel, S. (2014). Microglia Modulate Wiring of the Embryonic Forebrain. *Cell Reports*, *8*(5), 1271–1279.
- Stevens, B., Allen, N. J., Vazquez, L. E., Howell, G. R., Christopherson, K. S., Nouri, N., Micheva, K. D., Mehalow, A. K., Huberman, A. D., Stafford, B., Sher, A., Litke, A. M. M., Lambris, J. D., Smith, S. J., John, S. W. M., & Barres, B. A. (2007). The Classical Complement Cascade Mediates CNS Synapse Elimination. *Cell*, *131*(6), 1164–1178.
- Szalay, G., Martinecz, B., Lénárt, N., Környei, Z., Orsolits, B., Judák, L., Császár, E., Fekete, R., West, B. L., Katona, G., Rózsa, B., & Dénes, Á. (2016). Microglia protect against brain injury and their selective elimination dysregulates neuronal network activity after stroke. *Nature Communications*, *7*(May), 11499.
- Ueno, M., Fujita, Y., Tanaka, T., Nakamura, Y., Kikuta, J., Ishii, M., & Yamashita, T. (2013). Layer V cortical neurons require microglial support for survival during postnatal development. *Nature Neuroscience*, *16*(5), 543–551.
- Verney, C., Monier, A., Fallet-Bianco, C., & Gressens, P. (2010). Early microglial colonization of the human forebrain and possible involvement in periventricular white-matter injury of preterm infants. *Journal of Anatomy*, *217*(4), 436–448.
- Wang, C., & Youle, R. J. (2009). The role of mitochondria in apoptosis. *Annual Review of Genetics*, *43*, 95–118.

9. Függelék

9.1. Az alkalmazott elsődleges antitestek listája

2. Táblázat Az immunfluoreszcens hisztokémia során felhasznált elsődleges antitestek.

Elsődleges antitestek	Gazdaállat	Gyártó	Katalógusszám	Hígítás
C1q	nyúl	Abcam	ab182451	1:500
CX43	egér	ThermoFisher	13-8300	1:500
CX46	nyúl	Abcam	ab203564	1:500
eGFP	csirke	Invitrogen	A10262	1:2000
Kv2.1	egér	NeuroMab	75-014	1:500
MAP2	tengerimalac	Synaptic Systems	188 004	1:500
P2Y12R	nyúl	naspec	AS-55043A	1:500
TOM20	nyúl	Santa Cruz	sc-11415	1:1000

9.2. Az alkalmazott másodlagos antitestek listája

3. Táblázat Az immunfluoreszcens hisztokémia során felhasznált másodlagos antitestek.

Elsődleges antitestek	Gazdaállat	Gyártó	Katalógusszám	Hígítás
Alexa 488 anti-csirke	szamár	Jackson	703-546-152	1:500
Alexa 488 anti-nyúl	szamár	Jackson	711-546-152	1:500
Alexa 594 anti-tengerimalac	kecske	LifeTech	A11076	1:500
Alexa 594 anti-egér	szamár	LifeTech	A21203	1:500
Alexa 594 anti-nyúl	szamár	LifeTech	A21207	1:500
Alexa 647 anti-egér	szamár	Jackson	711-605-150	1:1000
Alexa 647 anti-nyúl	szamár	Jackson	711-605-152	1:500

9.3. Nyilatkozat a hallgatói munkáról

A dolgozatban bemutatott munka a kutatási téma jellegéből adódóan a Kísérleti Orvostudományi Kutatóintézet Neuroimmunológia Kutatócsoport keretein belül került kivitelezésre. Saját munkám a lentebb összefoglalt pontokban olvasható.

- A 6.1., 6.2., illetve 6.3. fejezetekben részletezett eredményekhez a következőkben járultam hozzá:
 - Konfokális lézer-pásztázó mikroszkópia témavezetői segítséggel
 - Mérés, adatelemzés: A végső elemszám a kutatócsoport több tagjának munkája.
- A 6.4. és 6.5. fejezetekben részletezett eredményekhez a következőkben járultam hozzá:
 - Immunfluoreszcens reakciók kivitelezése
 - Konfokális lézer-pásztázó mikroszkópia témavezetői segítséggel
 - Mérés, adatelemzés